

Aus der Abteilung Embryonalpharmakologie im Institut für
Anatomie des Fachbereichs für natur- und sozialwissen-
schaftliche Grundlagenmedizin und medizinische Ökologie
der Freien Universität Berlin

VERSUCHE ZU EINER QUANTITATIVEN CHARAKTERISIERUNG DER
TERATOGENEN EFFEKTE VON 5-BROM-2'-DESOXYURIDIN AN DER
FETALEN EXTREMITÄT VON NMRI-MÄUSEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt
von

Brigitte Annemarie (genannt Gitti) Michels
Tierärztin aus Worms

Berlin 1976
Journal-Nr. 884



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung Embryonalpharmakologie im Institut für
Anatomie des Fachbereichs für natur- und sozialwissen-
schaftliche Grundlagenmedizin und medizinische Ökologie
der Freien Universität Berlin

VERSUCHE ZU EINER QUANTITATIVEN CHARAKTERISIERUNG DER
TERATOGENEN EFFEKTE VON 5-BROM-2'-DESOXYURIDIN AN DER
FETALEN EXTREMITÄT VON NMRI-MÄUSEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt
von

Brigitte Annemarie (genannt Gitti) Michels
Tierärztin aus Worms

Berlin 1976

Journal-Nr. 884

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender des FBR: Prof. Dr. H.-H. Frey

Referent: Prof. Dr. E. Künzel

Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Merker



Tag der Promotion: 10. September 1976

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. MERKER, Abt. Embryonalpharmakologie am Institut für Anatomie (Humanmedizin), bin ich für die Überlassung des Themas und sein stetes förderndes Interesse aufrichtig zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. med. M. POSPISIL, Institut für Anatomie, danke ich herzlich für die Beratung bei den Skelettanalysen.

Die der Arbeit zugrundeliegenden Tierversuche stammen aus dem Institut für Pharmakologie. Herrn Prof. Dr. D. NEUBERT und seinen Mitarbeitern möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Tiermaterials danken.

Herr Assist.-Prof. Dr. rer. nat. R. ROETZ hat mich bei der Aufbereitung des Materials, bei der statistischen Bearbeitung der Meßwerte und deren Diskussion sowie bei der Sichtung des bereits über die Wirkungen von BUdR Veröffentlichten beraten. Es ist mir ein Bedürfnis, ihm an dieser Stelle meinen besonderen Dank hierfür auszudrücken.

Die dieser Untersuchung zugrundeliegenden Tierversuche wurden im Rahmen und mit Unterstützung des Sonderforschungsbereichs 29 "Embryonale Entwicklung und Differenzierung (Embryonalpharmakologie)" durchgeführt.

GLIEDERUNG

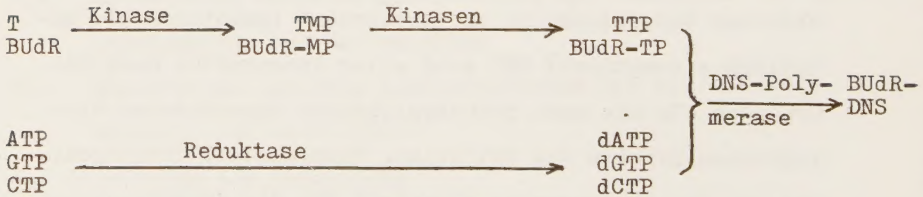
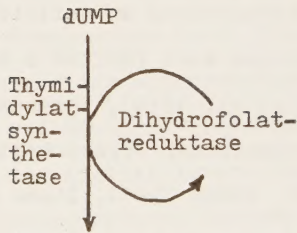
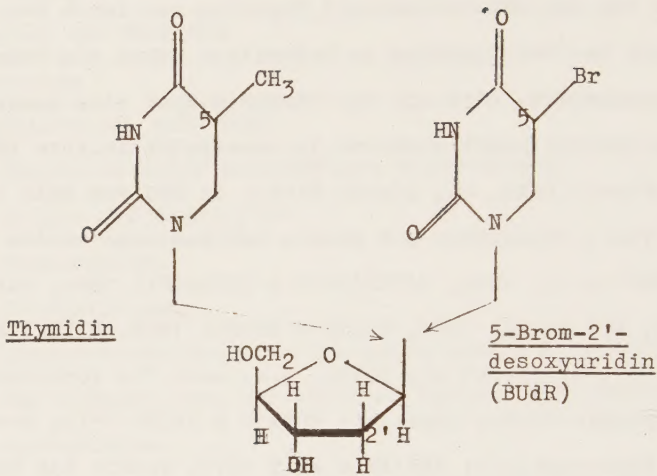
1. Einleitung
 2. Material und Methoden
 3. Ergebnisse
 - 3.1. Mißbildungen nach BUdR
 - 3.1.1. Induktion eines überzähligen Rippenpaares
 - 3.1.2. Oligo- und Adaktylien
 - 3.1.3. Syndaktylien
 - 3.1.4. Polydaktylien
 - 3.1.5. Unterschiede der Mißbildungshäufigkeiten zwischen den Körperseiten und zwischen Vorder- und Hinterextremitäten
 - 3.1.6. Dosis-Wirkungsbeziehungen der Teratogenität von BUdR
 - 3.2. Reduktionen der Knochenlängen
 - 3.2.1. Dosis-Wirkungsbeziehungen der Wachstumshemmung der Extremitätenknochen durch BUdR
 - 3.2.2. Unterschiede der Wachstumshemmung durch BUdR zwischen Vorder- und Hinterextremitäten
 - 3.3. Einflüsse des Applikationszeitpunktes auf die teratogene und das Knochenwachstum hemmende Wirkung von BUdR
 - 3.4. Beziehungen zwischen Ossifikation der Phalangen und Knochenwachstum der Extremitäten
 - 3.5. Beziehungen zwischen Knochenwachstum und Art distaler Mißbildungen nach BUdR
 4. Diskussion der Ergebnisse
 5. Zusammenfassung
Summary
 6. Literatur
- Anhang: Ergebnisse der statistischen Analysen
Lebenslauf

1. Einleitung

5-Brom-2'-desoxyuridin (BUdR), ein Pyrimidinderivat, das sich von dem DNS-Bestandteil Thymidin nur durch den Austausch der Methylgruppe in 5-Position gegen ein Bromatom unterscheidet, wird wie das Thymidin über eine enzymatisch katalysierte Reaktionskette in neu-synthetisierte DNS eingeschleust. (Abb. 1). Dieser Einbau in DNS von BUdR ist für viele Organismen und Gewebe nachgewiesen worden (z.B. CHEONG et al. 1960, DJORDJEVIC & SZYBALSKI 1960, HAKALA 1959, KIT et al. 1966, KRISS & REVESZ 1962, RITZKI & RITZKY 1969, RITZKI et al. 1972), u.a. auch für verschiedene embryonale Gewebe (Seeigel: KOTZIN & BAKER 1972; Area opaca des Hühnerembryos: FABIAN & WILT 1973; Gewebe des Mäuseembryos: PACKARD jr. et al. 1973).

Durch diesen Einbau des BUdR, der nach einigen Autoren quasi selektiv mit gewissen Affinitäten zu definierten Abschnitten und Funktionen erfolgen soll (KOTZIN & BAKER 1972, LIN & RIGGS 1972, SCHWARTZ et al. 1974), verändern sich jedoch auch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der DNS (BALDWIN & SHOOTER 1963, ROWND 1967). Diese allgemeinen Veränderungen der DNS und/oder selektive Beeinflussungen distinkter Genregionen in so "mutierter" (meiotisch wie mitotisch = somatisch) DNS sind aller Voraussicht nach die Ursachen für die nach BUdR-Applikation beobachteten biologischen Effekte wie Cytostase, Mutagenität, Teratogenität und Immunsuppression. Speziell für die experimentelle Embryologie ist BUdR zu einer Modells substanz für das Studium von Differenzierungsprozessen (Diskussion bei WILT 1972) geworden. Ganz besonderes Interesse gilt dieser Sub-

Abbildung 1



Einbau des Basenanalogen BUdR in DNS.

stanz auch deshalb, weil SCHUBERT & JACOB (1970) Neuroblastom-Zellen mit BUdR zur Ausdifferenzierung bringen konnten, wodurch eine "Entmalignisierung" erreicht wurde.

Aus dem großen Wirkungsspektrum des BUdR sollen zur Ergänzung - und auch zum Beweis, daß für diese Substanz keine Gewebespezifität erwartet werden kann - noch erwähnt werden:

- Cytotoxizität an epithelialen Geweben (LITTLEFIELD & GOULD 1960);
- Hemmung der Dottersack-Erythropoese beim Hühnerembryo (MIURA & WILT 1971);
- Hemmung der Brustdrüsendifferenzierung (TURINGTON et al. 1971);
- Hemmung der Differenzierung des Neocortex (WEBSTER et al. 1973);
- Suppression der Antikörperbildung in vitro (DUTTON et al. 1960);
- Unterdrückung der Pigmentierung in Melanomkulturen (WRATHAL et al. 1973).

Die Differenzierung von Myoblasten soll durch BUdR irreversibel (BISCHOFF et al. 1970, CHACKO 1972, CHACKO & JOSEPH 1974), nach anderen (COLEMAN et al. 1969, 1970; STOCKDALE & O'NEILL 1973, STOCKDALE & O'NEILL 1974) jedoch reversibel (Austausch von BUdR in DNS durch Thymidin) gehemmt werden. Vorwiegend in Gewebekulturen (ABBOTT & HOLTZER 1968, 1972; CHACKO et al. 1969, ANDERSON et al. 1970, HOLTHAUSEN et al. 1969, LASHER & CAHN 1969, MARZULLO 1972) von Chondrozyten, aber auch in Kulturen explan-

tierter embryonaler Extremitäten (LEVITT & DORFMAN 1972, WASYLIW 1973, NEUBERT et al. 1974) wurden BUdR-Wirkungen auf die embryonale Skelettentwicklung untersucht.

Nach Applikation an trächtige Ratten (vgl. CHAUBE & MURPHY 1968), Hamster (RUFFOLO & FERM 1965) sowie Mäuse (DiPAOLO 1964, SKALKO et al. 1971, WASYLIW 1973, PACKARD jr. et al. 1974, NEUBERT et al. 1974) wirken BUdR oder sein homologes 5-Jod-2'-desoxyuridin (SKALKO & PACKARD jr. 1973) teratogen und embryotoxisch. DiPAOLO (1964) applizierte Bastardmäusen aus Kreuzungen C_3H FM x A zwischen dem 6. und 17. intrauterinen Entwicklungstag in variierten Intervallen mehrtägig verschiedene BUdR-Dosierungen und konnte mit Einzeltagesdosen ab 90 mg/kg ein isoliertes Auftreten von Polydaktylien beschreiben, wobei diese Mißbildungen ganz überraschend nur an den Großzehen der hinteren Extremitäten und hier fast ausschließlich rechtsseitig auftraten. SKALKO et al. (1971) applizierten ICR-Mäusen Einzeldosen von 300, 400 oder 500 mg BUdR/kg und registrierten neben Polydaktylien der Hinterextremitäten (Maximum der Induktion am d 9 p.c.) Gaumenspalten (Maximum d 10 p.c.) und Exencephalien in Verbindung mit Mikrognathie (Maximum d 7 p.c.), WASYLIW (1973), der hauptsächlich die Wirkungen von BUdR an kultivierten Explantaten von Vorderextremitäten untersucht hat, prüfte an DBA/2J-Mäusen die teratogene Wirkung von Dosierungen zwischen 500 und 3000 mg/kg nach einmaliger Applikation am Tag 11 bzw. 12 nach Befruchtung (d 10 bzw. d 11 p.c. unserer Rechnung; vgl. Material und Methoden) und fand mit 500 bzw. 1000 mg/kg nur geringe Frequenzen digitaler Entwicklungsstörungen,

dazu in größerem Umfang jedoch "mikromele" Knochenreduktionen, während bei den hohen Dosierungen BUdR stark embryotoxisch wirkte. In den Versuchen von WASYLIW (1973) wurden durch BUdR-Zusätze zu den Explantaten nur relativ geringfügige Veränderungen induziert, ähnlich wie in den Versuchen von NEUBERT et al. (1974), die in den Explantaten von NMRI-Mäusen nur dann Differenzierungsstörungen in Richtung Polydaktylie sahen, wenn die BUdR-Applikation bei den Müttern erfolgt worden war.

In den hier vorgelegten Versuchen an NMRI-Mäusen (Material aus Versuchen am Pharmakologischen Institut unter Leitung von D. NEUBERT) sollte ermittelt werden:

1. Lassen sich für BUdR Dosis-Wirkungsbeziehungen der Teratogenität nachweisen ?
2. Wird durch BUdR das normale Mißbildungsspektrum der NMRI-Inzucht durch Frequenzänderungen "normaler" oder durch Induktion "neuartiger" Mißbildungen verändert ?
3. Existieren Zusammenhänge zwischen Wachstumsreduktionen und bestimmten Mißbildungstypen ?

Da im Vordergrund der bekannten (s.o.) teratogenen BUdR-Wirkungen an allen Versuchstieren Skelettmißbildungen stehen, außerdem durch einfache Inspektion das Vorkommen fehlender oder abnormer Ossifizierungen sowie durch einfache und exakte Längenmessungen der langen Röhrenknochen in Präparaten des fetalen Skeletts Parameter zu einem vermuteten reduzierten Wachstum gewonnen werden können, wurde die vorliegende Studie auf Mißbildungen der Phalangen und die Entwicklung der Extremitäten beschränkt.

Ein Teil der hier vorgelegten Ergebnisse ist zusammen mit weiterführenden Untersuchungen (BUdR kombiniert mit $^{32}\text{PO}_4$ + ^{14}C -Glucose) bereits publiziert worden (ROETZ & MICHELS

2. Material und Methoden

Die mütterlichen NMRI-Mäuse erhielten ad libitum Altromin R-Futter und hatten freien Zugang zu Leitungswasser. Die Zucht erfolgte bei 25°C Stalltemperatur und 50 - 60 % Luftfeuchte. Zur exakten Bestimmung des Befruchtungszeitpunktes wurden die Tiere in einem veränderten Hell-Dunkel-Zyklus gehalten, in dem die Lichtperiode von 12 Uhr mittags bis 4 Uhr morgens dauerte.

Zur Paarung wurde morgens zwischen 8 und 10 Uhr zu je drei Weibchen ein männliches Tier gesetzt. Nach der Paarung wurden die Vaginalabstriche auf Anwesenheit von Spermien untersucht; bei positivem Spermiennachweis kommt es in durchschnittlich 80 % der Tiere zur Trächtigkeit. Der Tag des positiven Spermiennachweises wird als Tag Null bezeichnet.

5-Brom-2'-desoxyuridin (BUdR) wird in physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und intraperitoneal injiziert.

Es wurden appliziert:

d 9 p.c. - 200 bzw. 400 mg BUdR/kg;

d 10 p.c. - 400 bzw. 800 mg BUdR/kg.

Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten aliquote Mengen physiol. NaCl-Lösung i.p. appliziert.

Die trächtigen Tiere aller Versuchsgruppen wurden am Tag 18 p.c. mit Aether getötet und die Feten durch Sectio entnommen. Zur Darstellung des fetalen Skeletts wurden die Feten zunächst 14 Tage in 10%iger Formalinlösung fixiert, danach wurden Haut, Augen, subepidermales Fettgewebe und sämtliche Eingeweide entfernt. Nach Einlegen

des Restfetus für eine Stunde in destilliertes Wasser werden die Präparate die anschließenden 12 Stunden in Aceton übertragen, das nach den ersten 20 Minuten einmal gewechselt wird.

Die eigentliche Aufhellung der Embryonen und Anfärbung der Skelettelemente erfolgt in Anlehnung an Angaben bei JENSH & BRENT (1966) durch sechs- bis achttägiges Behandeln der Feten mit 10%iger KOH, in der 6 mg Alizarinrot S je Liter gelöst waren. Diese Lösung wurde jeweils bei Braunfärbung gewechselt. In den letzten beiden Tagen dieser Prozedur wurde die 10%ige KOH durch eine 1%ige Lauge ersetzt. Die so aufgehellten und angefärbten Feten wurden für 12 Stunden in ein 1 : 2 : 2-Gemisch aus Benzylalkohol, Äthanol und Glyzerin übertragen und danach bis zur Messung in Glyzerin aufbewahrt. Durch diese Anfärbung werden sehr klare Skelettdarstellungen erhalten, die zu einer Vermessung der Skelettelemente geeignet sind. Eine Schrumpfung oder Quellung der in Glyzerin aufbewahrten Präparate erfolgt nicht, wie einige Kontrollmessungen an über längere Zeiten aufbewahrttem Material gezeigt haben.

Die in der vorliegenden Arbeit speziell auf die Untersuchung der Extremitätenentwicklung ausgerichtete Inspektion der Skelettpräparate wurde nach Erhebungsbögen (Muster vgl. Abb. 2) durchgeführt, in die das Vorhandensein von Ossifikationspunkten vermerkt und auch die Resultate der Längenmessungen von Radius, Ulna und Humerus sowie Tibia, Fibula und Femur eingetragen wurden.

Die Längenmessungen erfolgten mittels ZEISS-Meßokular bei konstant 10facher Vergrößerung. Hierzu wurden die Extre-

Muster eines Auswertebogens

Untersucher:

BUdR-Serie

NMRI-Mäuse

Applikation d p.c

Versuchsgruppe: A/B/C/D/E

Skelettmißbildungen: ja/nein

Polydaktylie: ja/nein

andere Skelettfehlbildungen: ja/nein

14. Rippen: ja/nein

Vorderextremität:

links

rechts

—————>
R —————>
— H —————>
U —————>
—————>

—————>
R —————>
— H —————>
U —————>
—————>

Hinterextremität:

links

rechts

—————>
Fi —————>
— F —————>
T —————>
—————>

—————>
Fi —————>
— F —————>
T —————>
—————>

Anmerkungen: keine;

Datum:

mitäten mittels Präpariernadel vorsichtig abgetrennt und in die Längsachse der Meßeinteilung geschoben.

Die Auswertung des Zahlenmaterials erfolgte für die Häufigkeiten der induzierten Veränderungen durch statistische Berechnung im χ^2 -Verfahren, das - parameter-frei - hier angewendet werden kann. Die Mittelwertsvergleiche der metrischen Daten wurden nach dem einfachen t-Test durchgeführt. Wie die Summenprozentdarstellung in Abbildung 8 der Knochenlängen der Vorderextremitäten der Kontrolltiere zeigt, sind diese Werte symmetrisch und gut zentriert angeordnet, woraus auf das Vorhandensein einer GAUSS-Verteilung geschlossen und damit der t-Test Anwendung finden kann. Die Durchführung der statistischen Verfahren erfolgte nach Angaben bei WEBER (1967), die Bestimmung der Signifikanzen anhand der graphischen Tafeln von PATAU (publiziert bei BELITZ, 1960).

Die durchgeführten statistischen Vergleiche und ihre Ergebnisse sind im Anhang zusammengefaßt. Die Berechnungen wurden mit dem Taschenrechner SR-50 (Texas Instruments) vorgenommen.

3. Ergebnisse

Die Häufigkeiten der durch BUdR induzierten Mißbildungen sowie die Zahlenangaben zur Reduktion des durch BUdR veränderten Knochenwachstums sind - wie Beziehungen der BUdR-Wirkungen an den Extremitäten zueinander - in den nachfolgenden Tabellen 1 - 10 und Abbildungen 4 - 16 zusammengefaßt.

3.1. Mißbildungen nach BUdR

Neben hier nicht beschriebenen Veränderungen der Schädelknochen fallen bei der Inspektion des Rumpf- und Extremitätenskeletts der mit BUdR-behandelten Tiere neben seltenen Formanomalien einzelner Rippen ("leicht gewellt") sowie einem häufigen Vorkommen eines überzähligen Rippenpaares Mißbildungen der Finger und Zehen auf.

3.1.1 Induktion eines überzähligen Rippenpaares

Diese bei unseren Kontrolltieren unbekannte Anomalie wird bereits mit 200 mg BUdR/kg (d 9 p.c.) bei ca. 17% aller Feten induziert und kommt nach 400 mg BUdR/kg (d 9 p.c.) bei fast 40% aller Feten vor. Die an d 10 p.c. applizierten BUdR-Mengen induzieren diese Anomalie bei ca. jeweils 26% aller Feten (Abb. 3, Tab. 1).

3.1.2 Oligo- und Adaktylien

Einzelne Oligodaktylien - diagnostiziert durch das Fehlen der Ossifikation einzelner Finger oder Zehen - kommen in

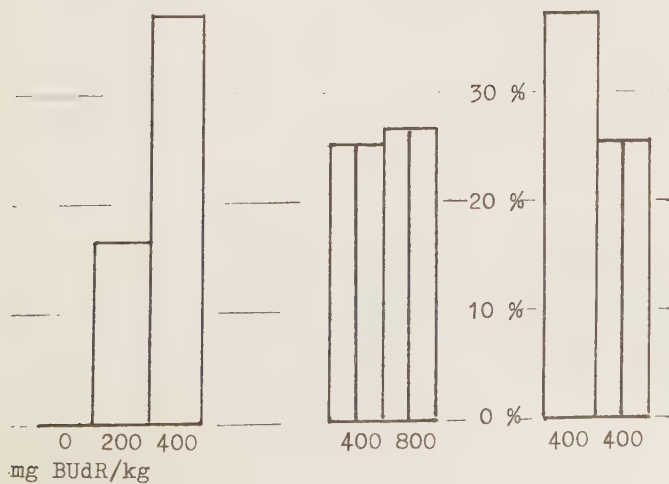
Tabelle 1

Induktion eines 14. Rippenpaares durch BUdR bei NMRI-Mäusen

Substanz	Dosis (mg/kg)	Applikation (d p.c.)	Feten (n) NMRI- Mäuse	Feten mit 14. Rippe	
				(n)	(%)
----	---	--	130	0	0
BUdR	200	9	253	42	16,6
BUdR	400	9	136	51	37,5
BUdR	400	10	82	21	25,6
BUdR	800	10	56	15	26,8

Abbildung 3

(vgl. vorstehende Tabelle)



Vorder- wie Hinterextremitäten unbehandelter NMRI-Mäuse zu ca. 1,5% vor. An den Vorderextremitäten sind Oligodaktylien nach 400 mg BUdR/kg (d 9 p.c.) nicht-signifikant vervierfacht. Mit 800 mg BUdR/kg werden an d 10 p.c. jedoch bei ca. 1/6 aller Feten Oligodaktylien gefunden (Tab. 2, Abb. 6). An den Hinterextremitäten werden Oligodaktylien mit keiner der verwendeten BUdR-Dosierungen signifikant vermehrt induziert. Hier treten jedoch nach 400 mg BUdR/kg (d 9 p.c.) bzw. 800 mg BUdR/kg (d 10 p.c.) bei 8,3 bzw. 5,4% aller Feten (Abb. 7, Tab. 5) vollständige Adaktylien auf, die bei unbehandelten Kontrollfeten nie gesehen wurden.

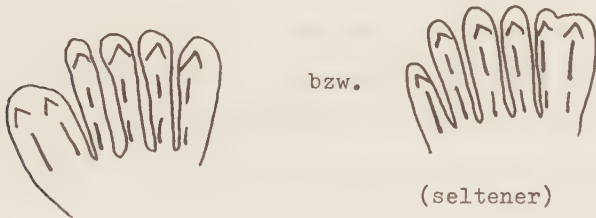
- Gelegentlich wurde zusätzlich das Fehlen einzelner Metatarsalia und Metacarpalia sowie das Fehlen von einzelnen Ossifikationszentren in Fingern und Zehen beobachtet (Tab. 2 u. 3, Abb. 4), doch sind diese Fehlbildungen im Vergleich mit den anderen Veränderungen nach BUdR unerheblich. -

3.1.3 Syndaktylien

Syndaktylien kamen an unserem Kontrollmaterial nicht vor. An den Vorderextremitäten von NMRI-Feten treten Syndaktylien als häutige Verschmelzungen der (2.) 3.-4. Fingerstrahlen nur nach 800 mg BUdR/kg (d 10 p.c.) bei ca. 11% aller Feten auf (Tab. 2, Abb. 6):



Gleichfalls nur am d 10 p.c. werden mit 400 bzw. 800 mg BUdR/kg in 22 bzw. 9% der Feten (Tab. 3, Abb. 7) Syndaktylien induziert, die jedoch von denen der Vorderextremitäten abweichen, da sie nur in Verbindungen mit Polydaktylien der Groß- bzw. (seltener) Kleinzehe vorkommen; durch diese Art Syndaktylie werden die polydaktylen Fingerstrahlen häutig mit den Groß- bzw. Kleinzehen verbunden:



3.1.4 Polydaktylien

Diese Fehlbildungen werden seit den Beobachtungen von DIPAOLO (1964) als Hauptwirkungen des BUdR auf die Entwicklung der Mäuseseextremität betrachtet. Polydaktylien treten bei unseren Kontrolltieren nicht auf. An den Vorderextremitäten behandelter Tiere werden sie (nicht-signifikant) bei maximal 2% aller Feten beobachtet (Tab.2, Abb. 5), treten jedoch an den Hinterextremitäten (Tab. 3, Abb. 7) zu 5,3% (400 mg BUdR/kg, d 9 p.c.) bzw. zu 29 - 33% bei Applikation an d 10 p.c. auf. Bei den an d 10 p.c. mit BUdR applizierten Polydaktylien kommt in einem großen Prozentsatz gleichzeitig Syndaktylie vor. Ohne erkennbare Seitenunterschiede wird bevorzugt die Großzehe verdoppelt.

3.1.5 Unterschiede der Mißbildungshäufigkeiten zwischen den Körperseiten und zwischen Vorder- und Hinterextremitäten.

Während Differenzen in der embryonalen Reaktion auf teratogene Reize zwischen Vorder- und Hinterextremitäten die durch den Kopf-Rumpf-Gradienten im Differenzierungstempo beschreibbaren Unterschiede widerspiegeln und bei allen Untersuchungen in der embryonalen Phase zu erwarten sind, müssen Unterschiede in der Reaktion der Körperseiten als zumindest sehr merkwürdig angesehen werden. In den vorliegenden Untersuchungen waren keine Seitenungleichheiten zu beobachten, obgleich die beschriebenen Oligo, A-, Syn- und Polydaktylien meist nur einseitig auftreten (zudem gleichfalls auch nur selten kombiniert).

Beträchtliche Unterschiede bestehen zwischen den Reaktionen der Vorder- und Hinterextremitäten der NMRI-Embryonen (Tab. 2 u. 3, Abb. 16) auf BUDR, wobei A- und Oligodaktylien an den Vorderextremitäten mit gleicher oder höherer Intensität als an den Hinterextremitäten, Polydaktylien jedoch praktisch ausschließlich an den Hinterextremitäten (speziell bei BUDR-Applikation am d 10 p.c.) induziert werden.

3.1.6 Dosis-Wirkungsbeziehungen der Teratogenität von BUDR

Klare Beziehungen zwischen applizierter BUDR-Dosis und induzierten Mißbildungen bestehen nur für die am d 9 p.c. induzierten überzähligen Rippen (Abb. 3). Einmalige BUDR-Applikationen von 400 mg/kg scheinen einen Schwellenwert darzustellen, bei dessen Überschreitung durch wachsende Embryotoxizität und -letalität eine Verfälschung der Ergebnisse erwartet werden muß. Polydaktylien werden an den

Abbildung 4

Häufigkeit von Ossifikationsstörungen an der Vorderextremität nach BUDR (vgl. Text)

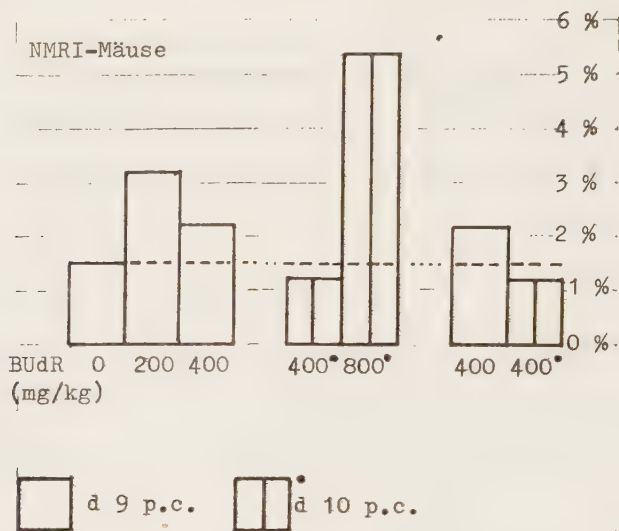


Abbildung 5

Häufigkeit von Polydaktylien nach BUDR an der Vorderextremität

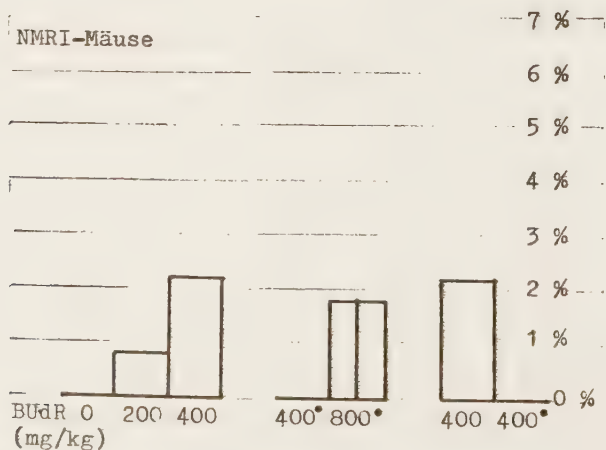


Abbildung 6

Oligo- und Syndaktylien der Vorderextremität nach BUdR

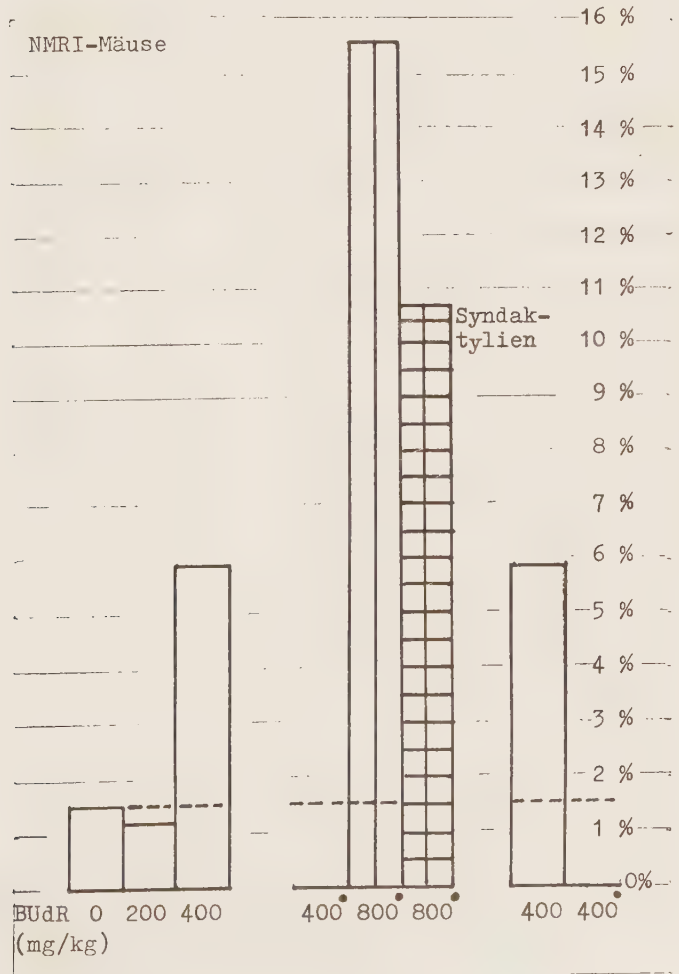


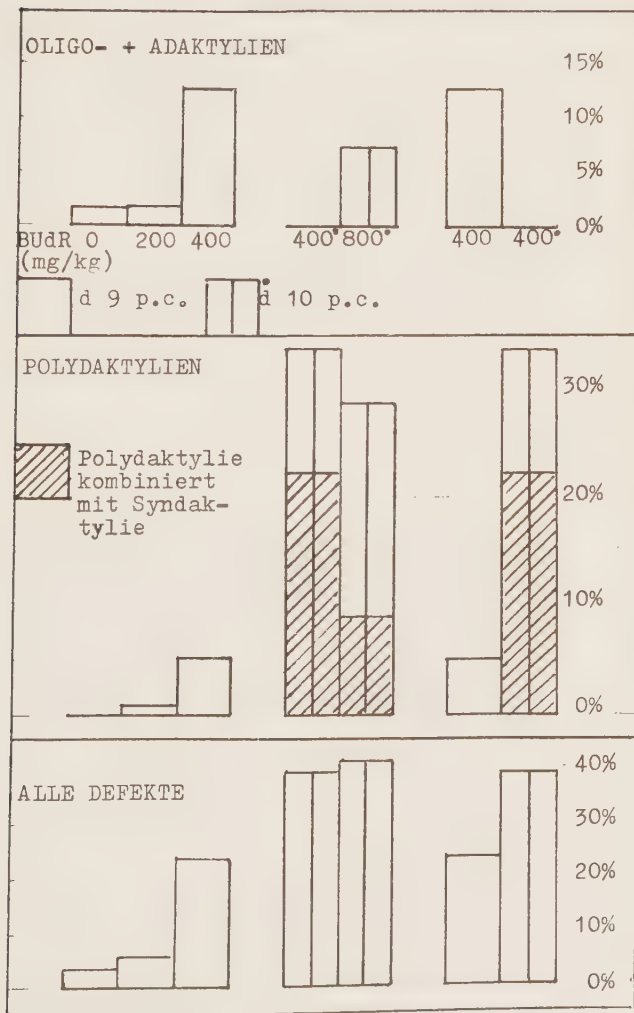
Tabelle 3

Mißbildungen nach BUdR an den Phalangen der hinteren Extremität von NMRI-Mäusen

BUdR (mg/kg)	0	200	400	400	800
Applikation (d p.c.)	-	9	9	10	10
Feten (n)	130	253	132	77	56
Polydaktylie n %	0 0	2 0,8	7 5,3	26 33,8	16 28,6
Syndaktylie ^x n %	0 0	0 0	0 0	17 22,1	5 8,9
Adaktylie n %	0 0	3 1,2	11 8,3	0 0	3 5,4
Oligodaktylie n %	2 1,5	1 0,4	6 4,5	0 0	1 1,8
Adaktylie + Oligodaktylie n %	2 1,5	4 1,6	17 12,9	0 0	4 7,1
Ossifikations- störungen n %	3 2,3	8 3,2	9 6,8	5 6,5	3 5,4
alle Defekte n %	5 3,8	14 5,5	31 23,5	30 39,0	23 41,1
^x nur in Verbindung mit Polydaktylie					

Abbildung 7

Induktion von Mißbildungen an den Phalangen der hinteren Extremitäten von NMRI-Mäusen durch BUDR



vorderen Extremitäten ab 400 (d 9 p.c.) bzw. 800 mg/kg (d 10 p.c.) induziert, an der hinteren Extremität ab 400 mg BUdR/kg, wobei die Effekte am d 10 p.c. durch Dosisverdoppelung nicht mehr gesteigert werden können. Oligo- (an den Hinterextremitäten auch A-)daktylien zeigen, wenn auch nur angedeutet und nur für die jeweils höchsten eingesetzten BUdR-Dosen mit statistischer Signifikanz eine gewisse Beziehung zwischen Dosis und Frequenz der Mißbildungen. Syndaktylien werden jeweils nur am d 10 p.c. induziert, an den Vorderextremitäten nur durch 800 mg BUdR/kg Körpergewicht.

3.2. Reduktionen der Knochenlängen

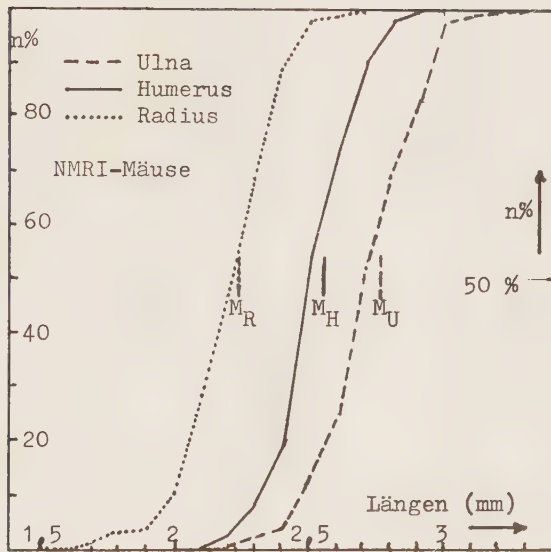
Reduktionen der langen Röhrenknochen wurden an allen untersuchten Elementen mit jeder der verwendeten BUdR-Dosierungen gemessen.

3.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehungen der Wachstumshemmung der Extremitätenknochen durch BUdR

Die gemessenen und unter BUdR-veränderten Knochenlängen der fetalen Extremitäten, die einer der GAUSSschen Kurve ähnliche statistische Verteilung (Abb. 8) zeigen, sind in den Tabellen 4 - 10 und den Abbildungen 11 - 15 zusammengefaßt und dargestellt.

Für alle Versuchsgruppen besteht eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung - mit steigender BUdR-Dosis nimmt die durchschnittliche Länge der langen Extremitätenknochen kontinuierlich ab (Abb. 12 u. 15), Unterschiede zwischen gleichen BUdR-Dosen an d 9 und 10 p.c. bestehen nicht.

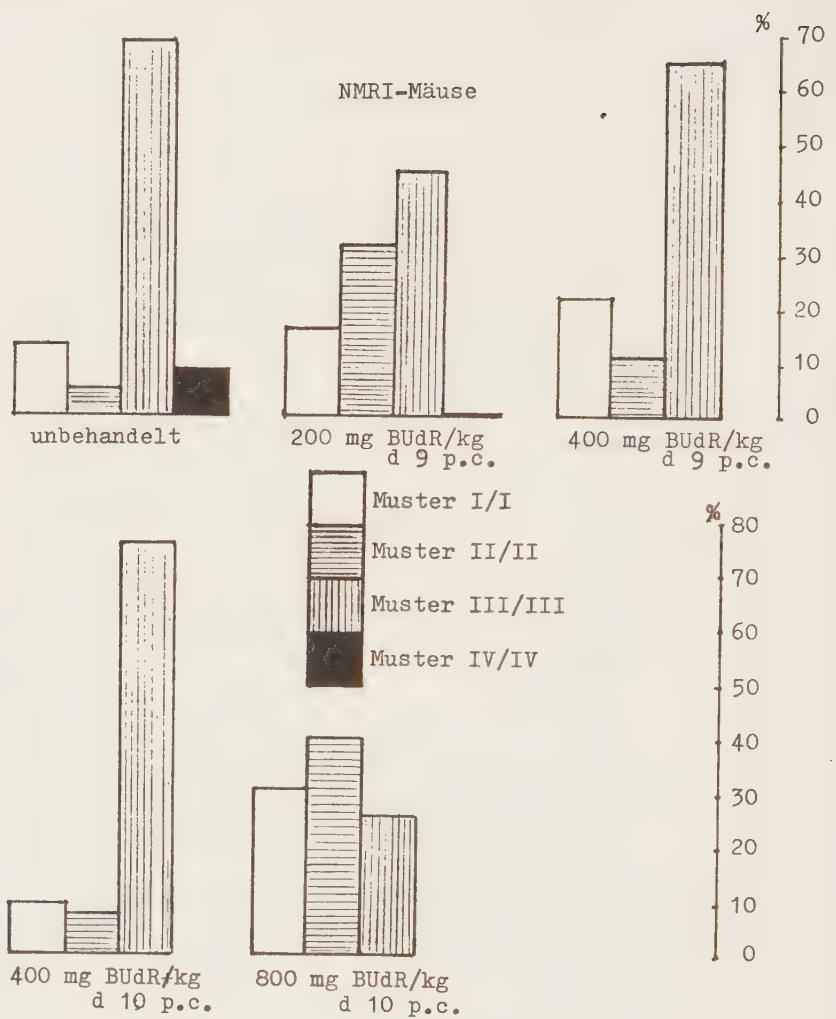
Abbildung 8



Verteilung (Summenprozentdarstellung)
der gemessenen Längen von Skelettelemen-
ten der Vorderextremität.

(Kontrollgruppe, $n = 244$; M_H , M_R , M_U =
Mittelwerte der Längen von Humerus bzw.
Radius bzw. Ulna)

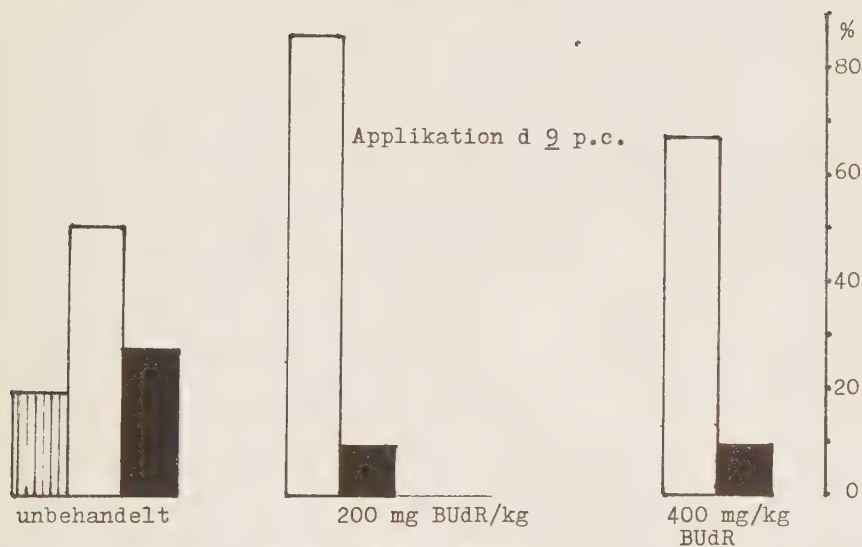
Abbildung 9



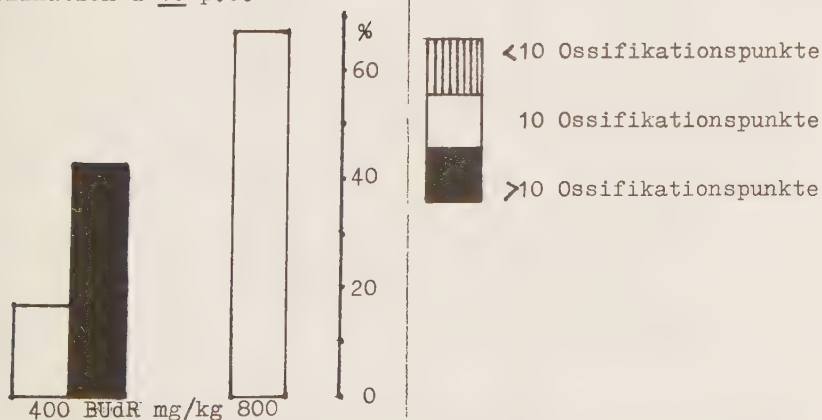
Häufigkeit der Ossifikationsmuster der Phalangen der Vorderextremität in den Versuchsgruppen.



Abbildung 10



Applikation d 10 p.c.



Häufigkeit der Anzahl von Ossifikationspunkten in den Phalangen der hinteren Extremität von NMRI-Mäusen nach Einwirkung von BUDR.

Abbildung 11

Beziehungen zwischen distaler Ossifikation und Femurlänge
bei NMRI-Mäusefeten

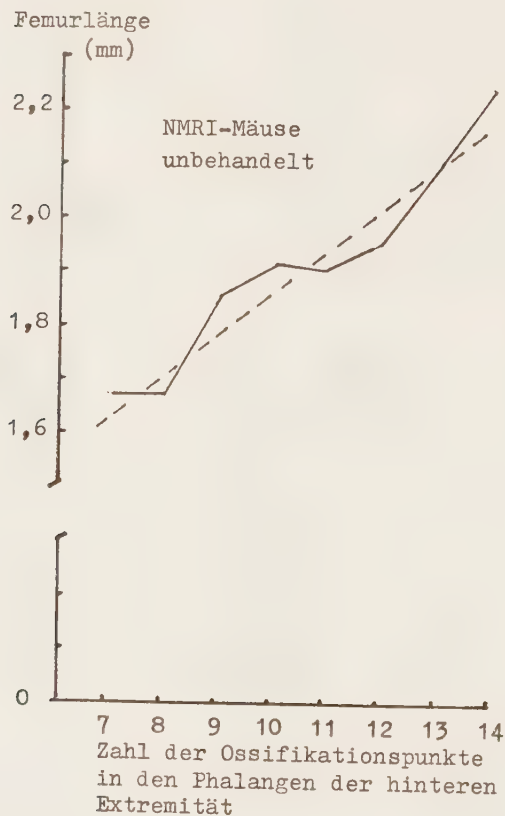


Tabelle 4

- 29 -

Längen der langen Röhrenknochen von NMRI-Mäusefeten nach
Einwirkung von BUDR: Vorderextremitäten

Humerus

1/10 mm	K	A1	A2	B1	B2	
(Anzahl der Messungen)						
16	-	-	2	-	-	K = Kontrolle
17	-	-	-	1	-	A1 = 200 mg/kg, d 9 p.c.
18	-	-	4	-	-	
19	-	2	6	-	2	A2 = 400 mg/kg, d 9 p.c.
20	1	18	28	14	22	
21	1	13	57	28	16	B1 = 400 mg/kg, d 10 p.c.
22	6	41	35	43	12	
23	13	87	51	32	20	B2 = 800 mg/kg, d 10 p.c.
24	26	80	22	11	6	
25	88	170	35	15	4	
26	45	27	-	5	-	
27	42	4	-	1	-	
28	17	-	-	-	-	
29	4	-	-	-	-	
30	1	-	-	-	-	
Summe:	244	442	240	150	82	

Radius

1/10 mm	K	A1	A2	B1	B2	
(Anzahl der Messungen)						
15	1	-	2	-	4	
16	-	4	4	-	4	
17	1	6	6	1	12	
18	6	22	24	18	10	
19	2	29	44	10	8	
20	16	127	74	44	26	
21	44	146	48	55	18	
22	46	59	22	17	-	
23	52	43	16	5	-	
24	50	4	-	-	-	
25	19	2	-	-	-	
26	6	-	-	-	-	
27	1	-	-	-	-	
Summe:	244	442	240	150	82	

Ulna

1/10 mm	K	A1	A2	B1	B2	
(Anzahl der Messungen)						
19	-	-	2	-	-	
20	1	4	6	-	1	
21	1	-	2	2	3	
22	-	12	8	6	10	
23	3	12	16	10	24	
24	6	16	38	13	14	
25	20	100	80	55	18	
26	30	102	23	36	10	
27	70	109	41	23	2	
28	37	60	22	5	-	
29	36	13	2	-	-	
30	33	14	-	-	-	
31	4	-	-	-	-	
32	1	-	-	-	-	
33	2	-	-	-	-	
Summe:	244	442	240	150	82	

Ossifikationsmuster der Phalangen und Längen der langen Röhrenknochen der Vorderextremitäten von NMRI-Mäusefeten nach intrauteriner Einwirkung von BUDR (I/I usw. = Ossifikationsmuster der Phalangen)

BUDR (mg/kg)	0	200	400	400	800
Applikation (d p.c.)	-	9	9	10	10
Feten (Zahl) mit verwertbarem Phalangenmuster	126	240	120	81	43
< I/I (n)	2	-	-	-	-
(%)	1,6	-	-	-	-
I/I (n)	17	38	27	7	13
(%)	13,5	15,8	22,5	8,6	30,2
II/II (n)	6	75	14	6	17
(%)	4,8	31,3	11,7	7,4	39,5
III/III (n)	88	108	79	62	11
(%)	69,8	45,0	65,8	76,5	25,6
IV/IV (n)	11	1	-	-	-
(%)	8,7	0,4	-	-	-
Mischformen (n)	2	10	-	6	2
(%)	1,6	7,5	-	7,7	4,7
Humeruslängen (mm)					
I/I	2,41	2,25	2,09	2,12	2,09
	± 0,14	± 0,15	± 0,13	± 0,07	± 0,14
II/II	2,48	2,30	2,07	2,16	2,18
	± 0,12	± 0,16	± 0,18	± 0,17	± 0,14
III/III	2,57	2,45	2,29	2,26	2,26
	± 0,14	± 0,13	± 0,14	± 0,16	± 0,15
IV/IV	2,63	-	-	-	-
	± 0,13	-	-	-	-
alle Feten (Muster I/I - IV/IV)	2,55	2,39	2,23	2,24	2,20
	± 0,15	± 0,15	± 0,18	± 0,16	± 0,16
Radiuslängen (mm)					
I/I	2,06	1,93	1,91	1,87	1,81
	± 0,17	± 0,11	± 0,15	± 0,09	± 0,19
II/II	2,10	2,03	1,91	1,94	1,93
	± 0,17	± 0,13	± 0,11	± 0,10	± 0,16
III/III	2,28	2,15	2,05	2,06	1,96
	± 0,16	± 0,11	± 0,14	± 0,11	± 0,15
IV/IV	2,39	-	-	-	-
	± 0,13	-	-	-	-
alle Feten (Muster I/I - IV/IV)	2,25	2,08	2,01	2,03	1,90
	± 0,18	± 0,14	± 0,16	± 0,16	± 0,18

Tabelle 5

(Fortsetzung)

BUdR (mg/kg)	0	200	400	400	800
Applikation (d p.c.)	-	9	9	10	10
Ulnalängen (mm)					
I/I	2,55 ± 0,17	2,45 ± 0,13	2,40 ± 0,17	2,44 ± 0,09	2,30 ± 0,13
II/II	2,65 ± 0,16	2,59 ± 0,12	2,35 ± 0,20	2,38 ± 0,13	2,38 ± 0,14
III/III	2,78 ± 0,17	2,70 ± 0,15	2,58 ± 0,15	2,55 ± 0,14	2,45 ± 0,15
IV/IV	2,86 ± 0,12	-	-	-	-
alle Feten (Muster I/I - IV/IV)	2,75 ± 0,19	2,62 ± 0,17	2,51 ± 0,19	2,52 ± 0,14	2,38 ± 0,15

Tabelle 6

Ossifikationsmuster der Phalangen und zugeordnete Längen der langen Röhrenknochen der Vorderextremitäten von NMRI-Mäusefeten nach Einwirkung von BUdR (I/I usw. = Ossifikationsmuster der Phalangen, vgl. Abb. 9; Zahlenangaben: Mittelwerte in % der Kontrollwerte, Standardabweichung in % der jeweiligen Mittelwerte der Versuchsgruppen).

BUdR (mg/kg)	0	200	400	400	800
Applikation (d p.c.)	-	9	9	10	10

Humeruslängen

I/I	100	93,4 ± 5,8 ± 6,7	86,7 ± 6,2	88,0 ± 3,3	86,7 ± 6,7
II/II	100	92,7 ± 4,8 ± 7,0	80,5 ± 8,7	87,1 ± 7,9	87,9 ± 6,4
III/III	100	98,8 ± 5,4 ± 5,3	89,1 ± 6,1	87,9 ± 7,1	87,9 ± 6,3
alle Feten (I - IV)	100	93,7 ± 5,8 ± 6,3	87,5 ± 8,1	87,8 ± 7,1	86,2 ± 7,3

Radiuslängen

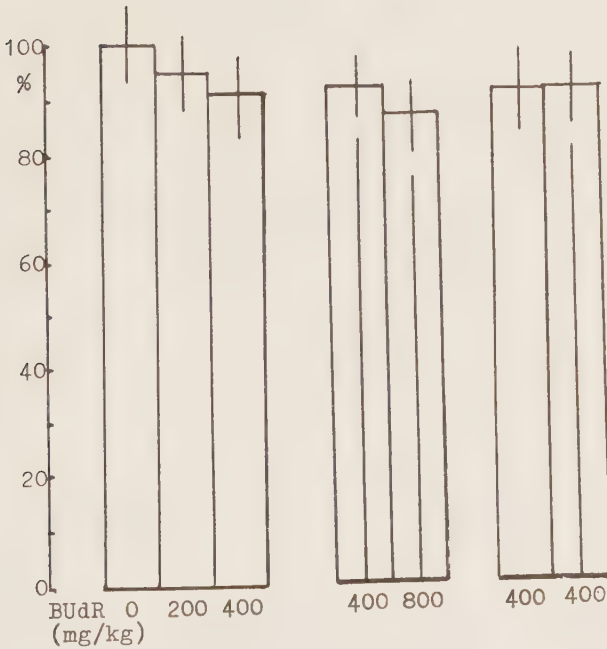
I/I	100	93,7 ± 8,3 ± 5,7	92,7 ± 7,9	90,8 ± 4,8	87,9 ± 10,5
II/II	100	96,7 ± 8,1 ± 6,4	91,0 ± 5,8	92,4 ± 5,2	91,9 ± 8,3
III/III	100	94,3 ± 7,0 ± 5,1	89,9 ± 6,8	90,4 ± 5,3	86,0 ± 7,7
alle Feten (I - IV)	100	92,4 ± 8,0 ± 6,7	89,3 ± 8,0	90,2 ± 6,4	84,4 ± 9,5

Ulnalängen

I/I	100	96,1 ± 6,7 ± 5,3	94,1 ± 7,1	95,7 ± 3,7	90,2 ± 5,7
II/II	100	97,7 ± 6,0 ± 4,6	88,7 ± 8,5	89,8 ± 5,5	89,8 ± 5,9
III/III	100	97,1 ± 6,1 ± 5,6	92,8 ± 5,8	91,7 ± 5,5	88,1 ± 6,1
alle Feten (I - IV)	100	95,3 ± 6,9 ± 6,5	91,3 ± 7,6	91,7 ± 5,6	86,5 ± 6,3

Abbildung 12

Reduktion der Extremitätenknochen von NMRI-Mäusefeten durch intrauterine Applikation von BUdR



 d 9 p.c.  d10 p.c.

Länge der Ulna

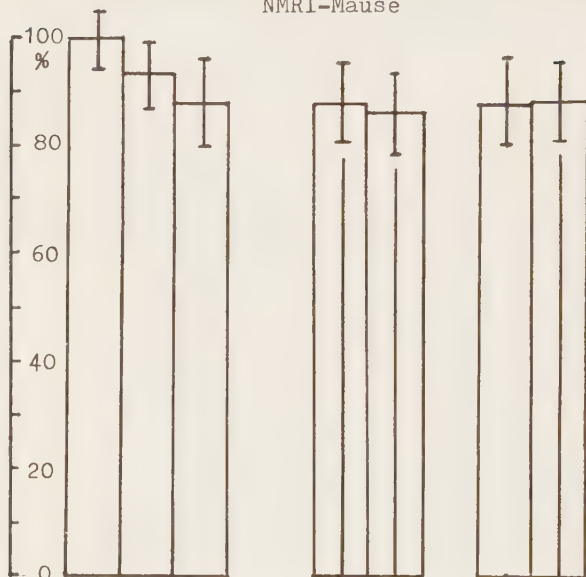
(Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung; unbehandelte Kontrollen = 100 %; Mittelwerte der Versuchsgruppen in % des Mittelwertes der Kontrollgruppe; Standardabweichung in % des jeweiligen Mittelwertes)

Abbildung 12

(Fortsetzung)

Länge des Humerus (Erläuterung s. vorstehende Abbildung)

NMRI-Mäuse



Länge des Radius (Erläuterung s. vorstehende Abbildung)

NMRI-Mäuse

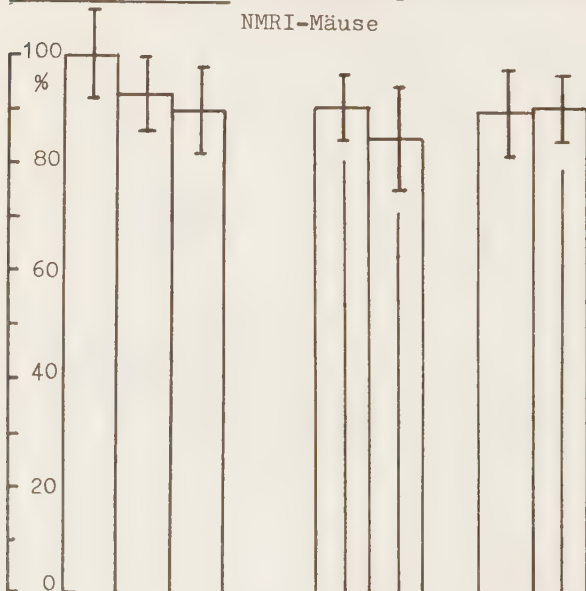
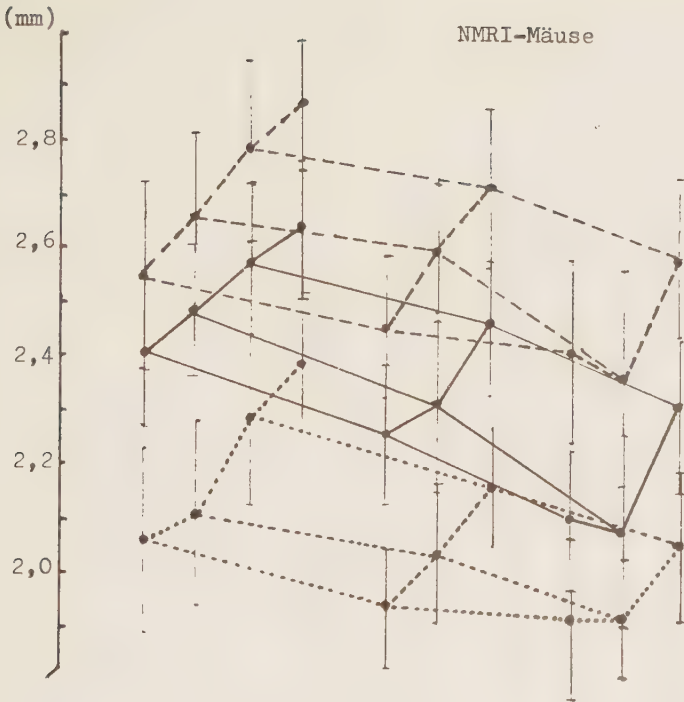
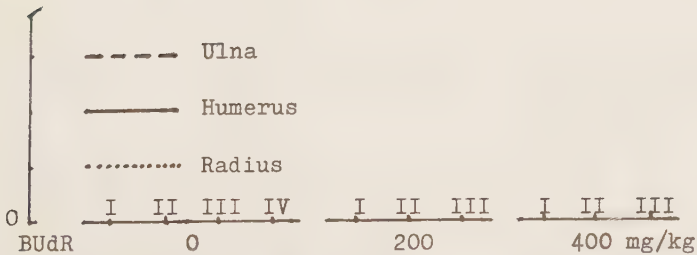


Abbildung 13



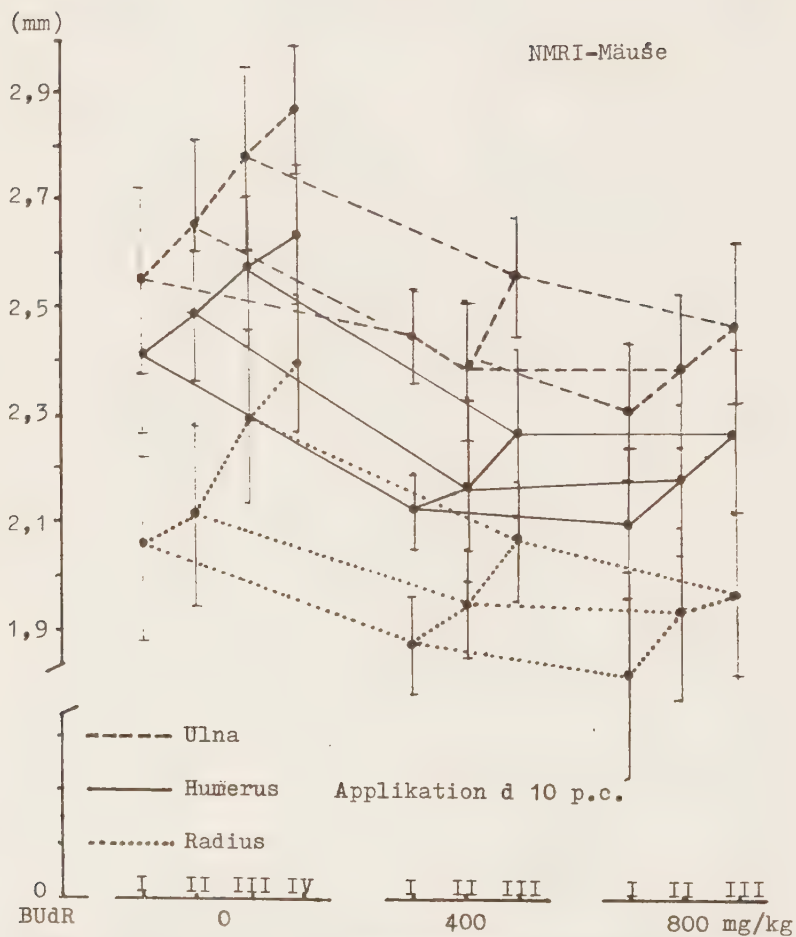
Applikation d 9 p.c.



Einfluß von BUdR auf die Entwicklung der langen Röhrenknochen der Vorderextremität.

Einfluß der Dosis (I, II, III, IV = Ossifikationsmuster der Phalangen).

Abbildung 14



Einfluß von BUdR auf die Entwicklung der langen Röhrenknochen der Vorderextremität.

Einfluß der Dosis (I, II, III, IV = Ossifikationsmuster der Phalangen).

Längen der langen Röhrenknochen von NMRI-Mäusefeten nach
Einwirkung von BUdR: hintere Extremitäten

Femur

(1/10 mm)	K	A1	A2	B1	B2
(Anzahl der Messungen)					
13	-	-	-	-	6
14	-	4	8	5	6
15	2	19	29	19	17
16	6	42	75	14	22
17	18	63	47	26	29
18	43	136	43	43	28
19	87	99	29	23	-
20	56	111	33	21	4
21	24	27	-	3	-
22	18	5	-	-	-
23	4	-	-	-	-
Summe:	258	506	264	154	112

Fibula

(1/10 mm)	K	A1	A2	B1	B2
(Anzahl der Messungen)					
14	-	-	-	-	1
15	-	8	8	1	11
16	-	5	6	1	14
17	3	28	18	16	24
18	10	29	32	15	26
19	25	84	58	9	18
20	30	139	71	50	12
21	67	108	29	35	6
22	50	64	19	13	-
23	32	20	21	13	-
24	27	16	2	1	-
25	13	5	-	-	-
26	1	-	-	-	-
Summe:	258	506	264	154	112

Tibia

(1/10 mm)	K	A1	A2	B1	B2
(Anzahl der Messungen)					
10	-	-	-	-	5
11	-	-	-	-	8
12	-	-	-	-	3
13	-	-	-	-	8
14	-	-	-	-	6
15	-	4	4	1	22
16	-	2	4	2	13
17	-	10	8	16	8
18	3	14	24	14	13
19	7	14	44	13	12
20	19	72	94	51	12
21	32	137	36	30	2
22	45	109	19	19	-
23	49	61	27	4	-
24	56	35	4	4	-
25	27	42	-	-	-
26	18	5	-	-	-
27	1	-	-	-	-
28	1	1	-	-	-
Summe:	258	506	264	154	112

Längen der langen Röhrenknochen der hinteren Extremität von NMRI-Mäusefeten nach Einwirkung von BUDR.

Femur

(1/10 mm)	Ka	Kb	Kc	A1b	A1c	A2b	A2c	A2d	A2g
14	-	-	-	4	-	2	-	6	-
15	2	-	-	14	-	11	-	18	-
16	6	-	-	37	2	61	-	14	-
17	14	4	-	59	2	43	2	2	-
18	10	25	4	124	10	33	3	2	5
19	14	56	9	99	-	15	7	-	7
20	2	39	15	87	16	11	14	2	6
21	-	4	20	6	16	-	-	-	-
22	-	-	18	2	-	-	-	-	-
23	-	-	4	-	-	-	-	-	-
Summe:	48	128	70	432	46	176	26	44	18

(1/10 mm)	B1b	B1c	B1d	B1g	B2b	B2g
13	-	-	-	-	4	2
14	1	-	4	-	2	-
15	10	1	6	-	9	4
16	5	5	2	2	16	6
17	4	13	-	9	19	10
18	4	23	-	16	22	4
19	2	8	-	13	-	-
20	-	16	-	5	4	-
21	-	-	-	3	-	-
Summe:	26	66	12	48	76	26

Fibula

(1/10 mm)	Ka	Kb	Kc	A1b	A1c	A2b	A2c	A2d	A2g
15	-	-	-	4	-	2	-	6	-
16	-	-	-	5	-	2	-	4	-
17	2	-	-	28	-	8	-	10	-
18	7	1	-	25	-	22	-	10	-
19	11	9	1	78	4	48	-	10	-
20	16	9	3	133	4	60	-	4	7
21	10	45	10	98	6	20	1	-	8
22	1	37	11	42	19	6	10	-	3
23	1	15	16	12	5	6	15	-	-
24	-	8	19	5	6	2	-	-	-
25	-	4	9	2	2	-	-	-	-
26	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Summe:	48	128	70	432	46	176	26	44	18

(1/10 mm)	B1b	B1c	B1d	B1g	B2b	B2g
14	-	-	-	-	-	1
15	-	-	1	-	9	1
16	-	-	1	-	5	4
17	6	1	8	-	17	6
18	8	3	2	1	21	5
19	1	3	-	5	12	4
20	6	27	-	17	8	4
21	5	16	-	14	4	2
22	-	7	-	6	-	-
23	-	8	-	5	-	-
24	-	1	-	-	-	-
Summe:	26	66	12	48	76	26

Längen der langen Röhrenknochen der hinteren Extremität von NMRI-Mäusefeten nach Einwirkung von BUdR.

(Fortsetzung)

Tibia

(1/10 mm)	Ka	Kb	Kc	A1b	A1c	A2b	A2c	A2d	A2g
15	-	-	-	4	-	-	-	4	-
16	-	-	-	-	-	2	-	2	-
17	-	-	-	8	-	2	-	6	-
18	3	-	-	14	-	14	-	10	-
19	3	2	-	13	-	30	-	14	-
20	12	6	-	66	2	79	-	8	7
21	18	10	2	136	-	29	-	-	7
22	9	23	9	92	12	10	7	-	2
23	1	33	14	50	10	8	17	-	2
24	2	35	19	29	2	2	2	-	-
25	-	12	14	17	18	-	-	-	-
26	-	7	10	2	2	-	-	-	-
27	-	-	1	-	-	-	-	-	-
28	-	-	1	1	-	-	-	-	-
Summe:	48	128	70	432	46	176	26	44	18

(1/10 mm)	B1b	B1c	B1d	B1g	B2b	B2g
10	-	-	-	-	2	3
11	-	-	-	-	6	-
12	-	-	-	-	2	1
13	-	-	-	-	6	-
14	-	-	-	-	2	4
15	-	-	1	-	15	5
16	-	-	2	-	9	2
17	7	2	7	-	7	1
18	7	1	2	2	11	2
19	2	7	-	4	6	4
20	6	26	-	19	8	4
21	4	10	-	16	2	-
22	-	15	-	4	-	-
23	-	3	-	1	-	-
24	-	2	-	2	-	-
Summe:	26	66	12	48	76	26

Erläuterungen zur Tabelle:

Zahlen = Anzahl der gemessenen Skelettelemente

Versuchsgruppen:

A = Applikation d 9 p.c.; B = Applikation d 10 p.c.; K = Kontrolle.

A1: 200 mg BUdR/kg; A2, B1: 400 mg BUdR/kg; B2: 800 mg BUdR/kg;

a: unter 10, b genau 10, c mehr als 10 Ossifikationspunkte in den Phalangen der hinteren Extremität; d = defekte Ossifikation (Oligodaktylien, Adaktylien, fehlende Metatarsalia etc.); g = gestörte Ossifikation (Polydaktylien, Mischformen der Phalangen-Ossifikation u.ä., nicht Fälle unter d).

Tabelle 9

Ossifikation (O.) der Phalangen und Osteometrie der langen Röhrenknochen der hinteren Extremitäten von NMRI-Mäusen nach Einwirkung von BUdR auf die intrauterine Entwicklung (OP = Ossifikationspunkte der Phalangen).

BUdR (mg/kg)	0	200	400	400	800
Applikation (d p.c.)	9	9	9	10	10
Feten (Zahl)	129	253	132	77	56
OP der Phalangen					
<10 $\frac{n}{\%}$ (Feten)	24 18,6	-	-	-	-
10 $\frac{n}{\%}$ (Feten)	64 49,6	216 85,4	88 66,7	13 16,9	38 67,9
>10 $\frac{n}{\%}$ (Feten)	35 27,1	23 9,1	13 9,8	33 42,9	-
Femurlänge (mm)					
< 10 OP	1,74 $\pm 0,13$	-	-	-	-
10 OP	1,91 $\pm 0,11$	1,83 $\pm 0,14$	1,70 $\pm 0,13$	1,62 $\pm 0,14$	1,67 $\pm 0,16$
> 10 OP	2,07 $\pm 0,13$	1,96 $\pm 0,15$	1,93 $\pm 0,10$	1,82 $\pm 0,13$	-
O. defekt	-	-	1,56 $\pm 0,13$	1,48 $\pm 0,07$	-
O. gestört	-	-	1,90 $\pm 0,08$	1,84 $\pm 0,12$	1,63 $\pm 0,16$
alle Feten	1,93 $\pm 0,15$	1,84 $\pm 0,16$	1,72 $\pm 0,16$	1,76 $\pm 0,17$	1,64 $\pm 0,16$
Tibiallänge (mm)					
< 10 OP	2,08 $\pm 0,13$	-	-	-	-
10 OP	2,30 $\pm 0,15$	2,14 $\pm 0,18$	2,01 $\pm 0,13$	1,87 $\pm 0,15$	1,60 $\pm 0,24$
> 10 OP	2,40 $\pm 0,15$	2,36 $\pm 0,15$	2,28 $\pm 0,06$	2,06 $\pm 0,14$	-
O. defekt	-	-	1,82 $\pm 0,15$	1,68 $\pm 0,08$	-
O. gestört	-	-	2,09 $\pm 0,10$	2,06 $\pm 0,12$	1,59 $\pm 0,32$
alle Feten	2,28 $\pm 0,19$	2,16 $\pm 0,19$	2,01 $\pm 0,17$	2,00 $\pm 0,18$	1,59 $\pm 0,29$

Tabelle 9

(Fortsetzung)

BUdR (mg/kg)	0	200	400	400	800
Applikation (d p.c.)	9	9	9	10	10
Fibulalänge (mm)					
< 10 OP	1,97 ± 0,13	-	-	-	-
10 OP	2,16 ± 0,14	2,00 ± 0,16	1,96 ± 0,15	1,88 ± 0,15	1,78 ± 0,16
> 10 OP	2,29 ± 0,15	2,19 ± 0,15	2,25 ± 0,06	2,07 ± 0,14	-
O. defekt	-	-	1,76 ± 0,15	1,69 ± 0,08	-
O. gestört	-	-	2,08 ± 0,07	2,08 ± 0,12	1,80 ± 0,17
alle Feten	2,15 ± 0,18	2,02 ± 0,18	1,96 ± 0,19	2,03 ± 0,18	1,77 ± 0,17

Tabelle 10

Ossifikationspunktzahlen (OP) der Phalangen und zugeordnete Längen der langen Röhrenknochen der hinteren Extremitäten von NMRI-Mäusefeten nach Einwirkung von BUDr (Zahlenangaben: Mittelwerte in % der Kontrollwerte, Standardabweichung in % der jeweiligen Mittelwerte der Versuchsgruppen).

BUDr (mg/kg)	0	200	400	400	800
Applikation (d p.c.)	-	9	9	10	10

Femurlängen

10 OP	100 ± 5,8	95,8 ± 7,7	89,0 ± 7,6	84,8 ± 8,6	87,4 ± 9,6
>10 OP	100 ± 6,3	94,7 ± 7,7	93,2 ± 5,2	87,9 ± 7,1	---
alle Feten	100 ± 7,8	95,3 ± 8,7	89,1 ± 9,3	91,2 ± 9,7	85,0 ± 9,8

Fibulalängen

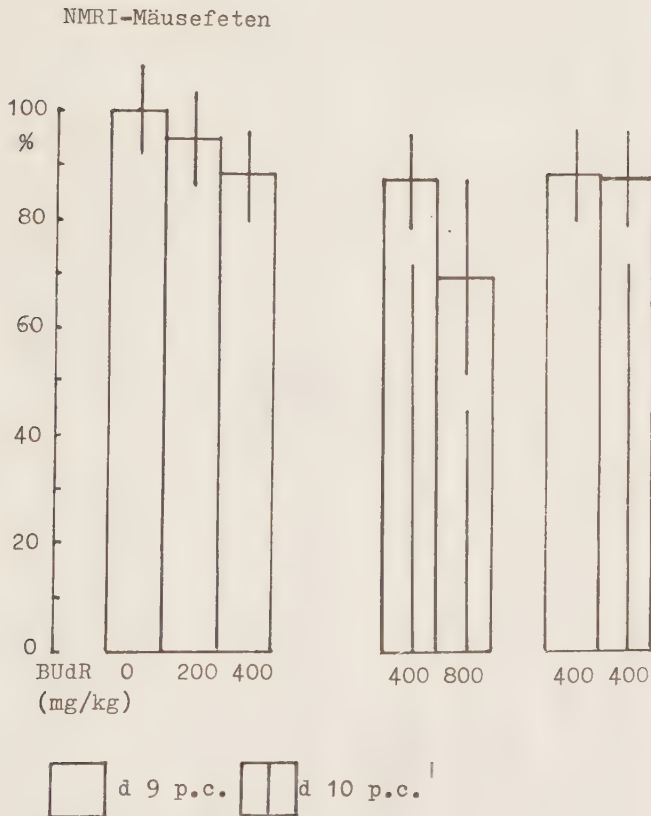
10 OP	100 ± 6,5	92,6 ± 8,6	90,7 ± 7,7	87,0 ± 8,0	82,4 ± 9,0
>10 OP	100 ± 6,6	95,6 ± 6,8	98,3 ± 2,7	90,4 ± 6,8	---
alle Feten	100 ± 8,4	94,0 ± 8,9	91,2 ± 9,7	94,4 ± 8,9	82,3 ± 9,6

Tibialängen

10 OP	100 ± 6,5	93,0 ± 8,4	87,4 ± 6,5	81,3 ± 8,0	69,6 ± 15,0
>10 OP	100 ± 6,3	98,3 ± 6,4	95,0 ± 2,6	85,8 ± 6,8	---
alle Feten	100 ± 8,3	94,7 ± 8,7	88,2 ± 8,5	87,7 ± 9,0	69,7 ± 18,2

Abbildung 15

Einfluß von intrauterin appliziertem BUdR auf die Längen von Extremitätenknochen.

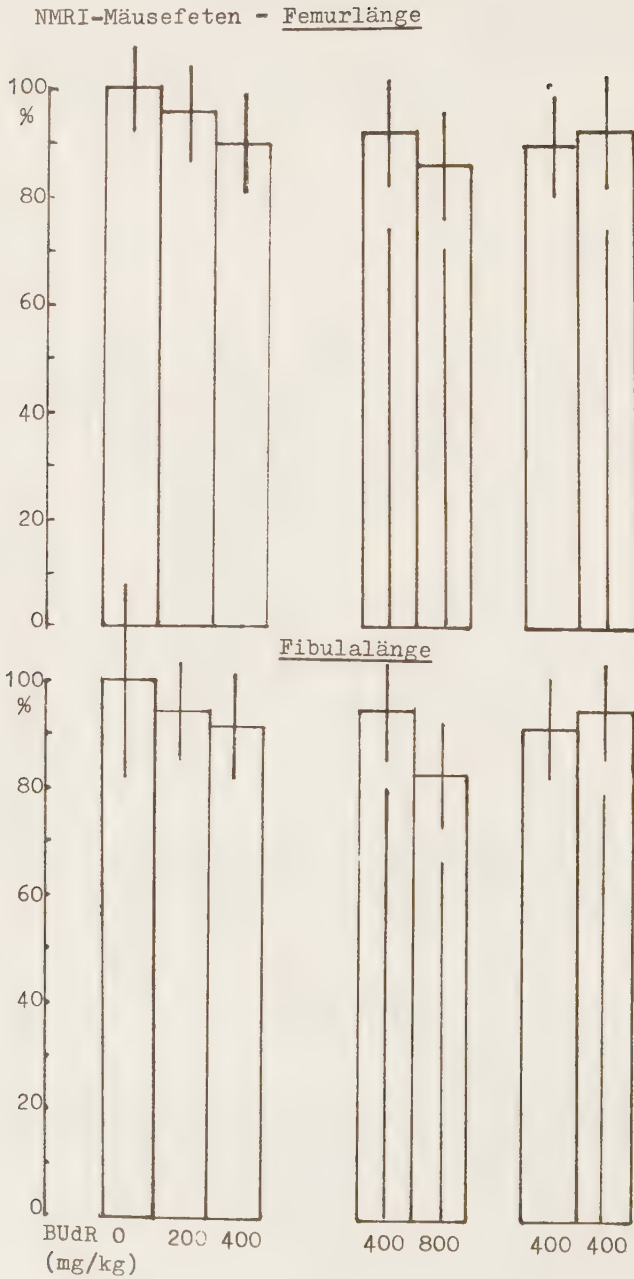


Länge der Tibia

(Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung; unbehandelte Kontrollen = 100 %; Mittelwerte der Versuchsgruppen in % des Mittelwertes der Kontrollgruppen; Standardabweichung in % des jeweiligen Mittelwertes)

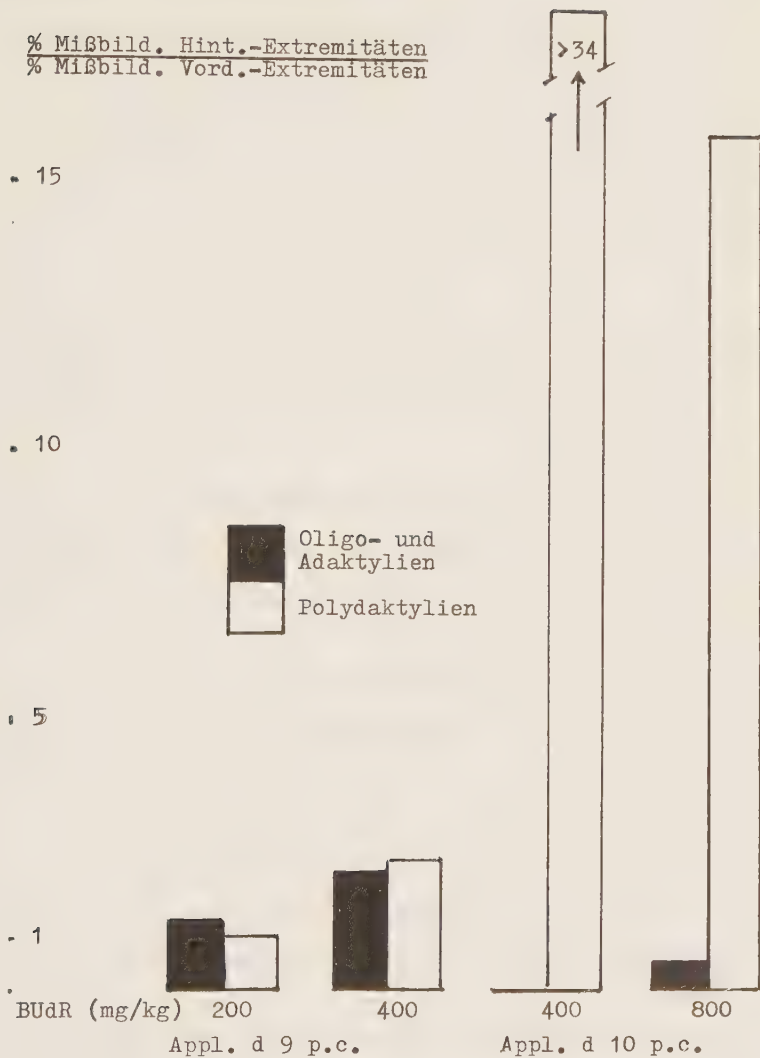
Abbildung 15

(Fortsetzung)



 d 9 p.c.  d 10 p.c.

Abbildung 16 (vgl. Text)



3.2.2 Unterschiede der Wachstumshemmung durch BUdR zwischen Vorder- und Hinterextremitäten.

Die stärksten Hemmeffekte des Knochenwachstums werden mit 800 mg BUdR/kg (d 10 p.c.) und als Reduktionen der Längen von 16% für den Radius und 31% für die Tibia gemessen. Fibula und Femur sowie Humerus und Ulna sind in ähnlichem Umfang (ohne Unterschiede untereinander) reduziert (Tab. 6 u. 10, Abb. 12 u. 15). Seitenunterschiede treten nicht auf.

3.3. Einflüsse des Applikationszeitpunktes auf die teratogene und das Knochenwachstum hemmende Wirkung von BUdR.

Hier kann ein direkter Vergleich für die beiden Versuchsgruppen durchgeführt werden, in denen die Muttertiere jeweils an d 9 bzw. d 10 p.c. 400 mg BUdR/kg appliziert erhielten. Dieser Vergleich ist in den Abbildungen 3 - 7 und 12 sowie 15 dargestellt worden.

Als Zeitpunkt der Induktion von Mißbildungen durch BUdR ergibt sich:

überzählige Rippen	d 10 > d 9 p.c.
Polydaktylien vorn	d 9
Polydaktylien hinten	d 10 > d 9
Syndaktylien hinten	d 10
Oligodaktylien vorn	d 9
A- u. Oligodakt. hinten	d 9

Zusammenfassend kann aus den Tabellen 2 und 3 unter Berücksichtigung der tatsächlichen Zahlen gesagt werden, daß durch BUdR-Applikation in wirksamer Dosierung am d 10 p.c. bei NMRI-Mäusen bevorzugt 14. Rippen, Polydaktylien und auch Syndaktylien erzeugt, bei Applikation d 9 p.c. in stärkerem Ausmaß Oligo- und Adaktylien gebildet werden.

3.4. Beziehungen zwischen Ossifikation der Phalangen und Knochenwachstum der Extremitäten

Bei der Auszählung der Ossifikationspunkte (OP) der Finger und Zehen (Abb. 9 und 10) fiel auf, daß besonders bei den Fingern bestimmte Muster der OP seitengleich auftreten. Diese OP-Muster der Finger (I/I ... IV/IV) entsprechen gleichzeitig OP-Zahlen (9, 11, 12 und 13 - 10 OP kamen in unserem Material nicht vor). Die OP der Zehen wurden in Gruppen < 10 , 10 und > 10 unterteilt.

Nach BUDR kommt es zu einer verzögerten Ossifikation, so daß die Finger-Muster IV praktisch ab 200 mg BUDR/kg nicht mehr auftreten - zusätzlich nehmen "unreifere" Muster an Häufigkeit zu. Ähnliches gilt auch für die Ossifikation der Zehen, wo nach 200 mg BUDR/kg (d 9 p.c.) bereits Extremitäten mit Zehen-OP > 10 seltener werden und bei 800 mg BUDR/kg (d 10 p.c.) nur noch 10 OP je Extremität gesehen werden.

Nimmt man nach diesen Ossifikationsmustern bzw. der Zahl der OP der Zehen eine Aufteilung der gemessenen Knochenlängen vor, so werden praktisch lineare gleichsinnige Beziehungen zwischen der Zahl der apikalen OP und dem Längenwachstum der Extremitätenknochen sichtbar (Abb. 11, 13 u. 14). Die zugrundeliegenden Zahlen sind in den Tabellen 5 und 9 enthalten. Die Korrelationen zwischen dem Tempo der apikalen Ossifikation und dem basaleren Knochenwachstum lassen sich statistisch absichern, so daß hier trotz der vorhandenen GAUSS-Homogenität (Abb. 8) das Zahlenmaterial aus wie vorstehend aufteilbaren Gruppierungen zusammengesetzt ist. Dieses geordnete Geschehen wird durch BUDR praktisch gleichsinnig beeinflusst.

3.5. Beziehungen zwischen Knochenwachstum und der Art distaler Mißbildungen nach BUDR

Die im vorstehenden Abschnitt referierten Ergebnisse legen den Versuch nahe, auch nach der Art der Mißbildung eine Aufgliederung des Knochenwachstums zu versuchen. Zu diesem Zweck wurden (Tab. 8 u. 9) die Längenmessungen von Extremitäten mit Oligo- und Adaktylien (sowie mit fehlenden einzelnen Metatarsalia und Metacarpalia) mit denen von Extremitäten mit Polydaktylien verglichen ("Defektmißbildungen" gegen "Überschußmißbildungen"). Eine statistische Analyse dieses Vergleichs konnte wegen ungenügend großer Zahlen nur an den hinteren Extremitäten durchgeführt werden. Hierbei ergab sich nun, daß mit hoher Signifikanz ($P < 0,0002$) die sogenannten "Defektmißbildungen" mit (im Vergleich zum durchschnittlichen Wert) stärker verkürzten Extremitäten kombiniert sind und die sogenannten "Überschußmißbildungen" an verlängerten Extremitäten vorkommen.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die Inkorporation von BUdR anstelle von Thymidin in DNS stellt sicher das entscheidende auslösende Ereignis auch der hier beschriebenen teratogenen Wirkungen dar. Die Veränderungen müssen irreversibel sein, da z.B. Wachstumsreduktionen ohne erkennbare morphologische Fehldifferenzierungen noch 9 Tage nach BUdR-Applikation nachgewiesen werden können.

Induziert werden durch BUdR anscheinend sehr unterschiedliche Effekte: einmal kann die somatisch-mutierte BUdR-DNS zu einer Ausbildung von für NMRI-Inzuchtmäusen "neuen" Mißbildungen wie Polydaktylien oder überzähligen Rippen führen oder aber zu einer Verstärkung von im Inzuchtgenom auch ohne erkennbare äußere Ursache gelegentlich realisierten Mißbildungen wie Oligodaktylien, die dann nicht nur häufiger, sondern auch bis hin zu Adaktylien verstärkt ausgeprägt werden. Die Induktion der beiden Syndaktylie-Formen durch BUdR läßt gleichfalls auf sehr unterschiedliche gestörte lokalisierte Mechanismen schließen: bei den isolierten Formen könnte ganz einfach das epidermo-mesenchymale Wechselspiel bei der häutigen Differenzierung der Fingerstrahlen gestört sein - bei den Kombinationen Polydaktylie-Syndaktylie müssen jedoch weitere Interpretationen bemüht werden, da diese Kombination ja nur in einem gewissen Prozentsatz der Fälle auftritt und bei den Fällen mit vollständiger Separierung der überzähligen Strahlen die Trennmechanismen angelegt sein müssen.

Diesen lokalisierbaren Strukturveränderungen in den Extremitäten nach BUdR gesellt sich eine allgemeine und nahezu gleichmäßige Depression des Wachstums der langen Extremitätenknochen. Mit zunehmender Verkürzung nimmt auch das distale Ossifikationstempo in Fingern und Zehen ab und treten in den verkürzten Extremitäten vermehrt Defektmisbildungen wie Oligo- und Adaktylien auf. Hierbei sollte man sich daran erinnern, daß im Gegensatz zu den meist vereinzelt bei der Befruchtung zur Ausprägung gelangenden meiotischen Mutationen somatische Mutationen vermutlich stets (dosisabhängig ?) eine größere Zahl von somatischen Zellen gleichzeitig betreffen, wozu ein Thymidinanalogen wie BUdR in besonders hohem Maße prädestiniert erscheint, und wobei wohl auch die Einsetzbarkeit der Modells substanz BUdR ihre Grenzen erreicht.

Das für die lokalen BUdR-Wirkungen nur unvollkommen erkennbare Dosis-Wirkungsgefüge wird in den vorliegenden Zahlen durch die Entwicklungsdifferenzen zwischen Vorder- und Hinterextremitäten und die zunehmende Embryotoxizität der höheren BUdR-Dosierungen überdeckt - es ist in sehr deutlicher Form eigentlich nur für die überzähligen Rippen darstellbar. Ob nun die "Mikromelisierung" der Extremitäten nach BUdR in ihrer klaren Dosisabhängigkeit bereits früher Ausdruck der beginnenden Embryotoxizität oder spezifischer Effekte ist, kann hier nicht beantwortet werden. Beides erscheint möglich, doch müßten dann bei der Annahme von bereits mit niedrigen Dosierungen BUdR erkennbaren Allgemeinschäden auch die "normalen" Oligodaktylien weniger als echte Misbildungen denn als "unspezifische" Mangelentwicklungen interpretiert werden.

Diese Überlegungen werden noch weiterhin dadurch kompliziert, daß durch simultane Applikation von 200 mg BUdR/kg (d 9 p.c.) mit 2 mCi ^{14}C -Glucose + $^{32}\text{PO}_4$ ausnahmslos für alle Effekte des BUdR an der sich entwickelnden Mäuseextremität - Wachstumsveränderungen wie lokale Mißbildungen - eine Wirkungsverstärkung vom Umfang mindestens einer BUdR-Wirkungsverdoppelung eintritt (ROETZ & MICHELS 1976).

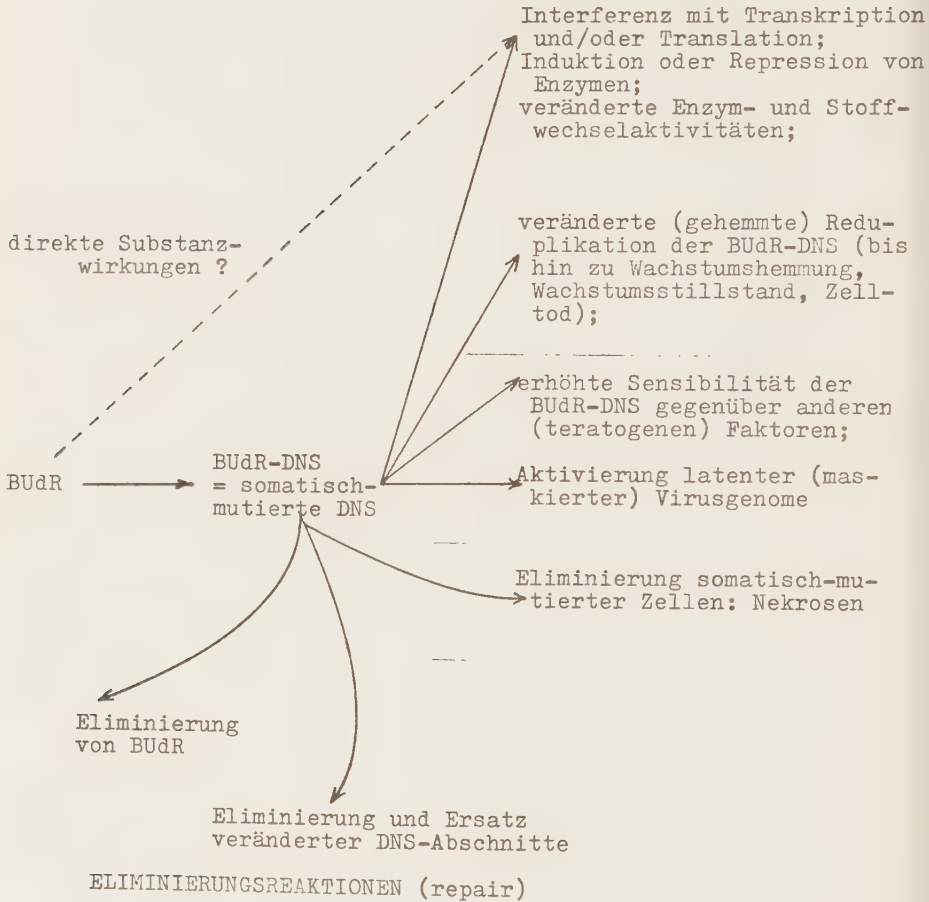
Die Zusammenschau der mit BUdR durchgeführten umfangreichen biochemischen Untersuchungen der letzten 20 Jahre mütet wie ein ungezieltes Screening an. Nach gerichtetem(?) /ungerichtetem (?) BUdR-Einbau - eine gewisse Selektivität ist eigentlich wie für alle Cytostatica nur durch die Wirkung an schnell wachsenden Geweben gegeben - werden Prozesse der Transkription bzw. Translation (GOZ 1974, KOYAMA & ONO 1971, STELLWAGON & TOMKINS 1971, MARZULLO 1972, LYKKESFELDT & ANDERSEN 1975), meist ausgedrückt als Neuinduktion oder Hemmung spezifischer Enzyme, der Genregulation (LIN & RIGGS 1972), aber im Zusammenhang von BUdR-Wirkungen an Gliomzellen auch das cyclische AMP in die veränderte Wirkungskette der BUdR-DNS einbezogen gefunden (SCHWARTZ et al. 1974). Mit großer Intensität sind auch die Folgen des BUdR-Einbaus in DNS von Chondrozyten- oder "limb bud"-Kulturen verfolgt worden, wobei veränderte Synthesen von Glycosaminoglycanen (BISCHOFF & HOLTZER 1968, BISCHOFF 1971, KOYAMA & ONO 1971, MAYNE et al. 1971, PALMOSKI & GOETINCK 1972, WASYLIW 1973) in Beziehungen zu Störungen der mesenchymalen Differenzierung gesetzt werden.

In weiteren umfangreichen Untersuchungen - meist an Tumor-

Abbildung 17

Mechanismen der teratogenen Wirkung von BUdR

HYPOTHESEN ZUR TERATOGENEN WIRKUNG
VON BUdR:



zellkulturen - wurde mehrfach nachgewiesen, daß nach Einbau von BUdR in der veränderten DNS eine erhöhte Sensibilität gegenüber Zweitfaktoren wie sichtbares Licht (JONES & DOVE 1972, FUCH & KAO 1967), UV-Bestrahlung (CLEAVER 1962) und Röntgenstrahlen (DJORDJEVIC & SZYBALSKI 1960, SZYBALSKI & DJORDJEVIC 1960, SANO et al. 1968, SCAIFE 1970) existiert und daß latente oder exogen-virulente Viren aktiviert werden (LOWY et al. 1971, GERBER 1972). Derartige Wechselwirkungen von BUdR mit anderen Faktoren sind vermutlich auch für die teratogene Potenzierung zwischen radioaktiven Substanzen und BUdR verantwortlich.

Eine Summe der gegenwärtigen hypothetischen Vorstellungen, ergänzt durch mögliche repair-Mechanismen, ist in Abbildung 17 schematisch zusammengefaßt. Welche der möglichen biochemischen Folgeeffekte für die Realisierung der nach BUdR an NMRI-Mäusen induzierten teratogenen Veränderungen verantwortlich ist, kann nicht entschieden werden - es kennzeichnet den Stand unserer heutigen Bemühungen um die Teratologie, daß dies bislang für keine teratogene Substanz möglich ist.

5. Zusammenfassung

1. Nach einer Übersicht über die bisher bekannten biologischen Wirkungen der Modellsubstanz BUdR besonders auf Differenzierungsprozesse werden eingehend die teratogenen Wirkungen der Substanz an Mäuseembryonen besprochen.
2. In den hier ausgewerteten Versuchen erhalten trächtige NMRI-Mäuse am 9. bzw. 10. intrauterinen Entwicklungstag einmalig 200 oder 400 bzw. 400 oder 800 mg BUdR/kg i.p. injiziert. Verglichen wird gegen eine Gruppe von Tieren, die aliquote Mengen physiol. NaCl-Lösung injiziert erhielten. Die zusammen 657 Feten wurden am d 18 p.c. durch sectio entnommen und zur Skelettdarstellung mit KOH aufgestellt und mit Alizarinrot S angefärbt.
3. Folgende im unbehandelten Kontrollmaterial nicht vorkommenden Mißbildungen wurden durch BUdR induziert: Polydaktylien, Adaktylien, zwei verschiedene Formen von Syndaktylie sowie überzählige Rippen. Polydaktylien werden ohne Bevorzugung einer Körperseite vornehmlich an den hinteren Extremitäten induziert.
4. Bei unbehandelten NMRI-Mäusefeten mit ca. 1,5% Häufigkeit auftretende Oligodaktylien werden durch BUdR vermehrt.
5. Durch genügend hohe Mengen BUdR werden am d 9 p.c. bevorzugt Oligo- und Adaktylien, am d 10 p.c. bevorzugt Polydaktylien, Syndaktylien und überzählige Rippen induziert.
6. Klare Dosis-Wirkungsbeziehungen bestehen für die Induktion überzähliger Rippen; für die anderen nach BUdR beschriebenen Mißbildungen scheinen Schwellenwerte in der Nähe von 400 mg BUdR/kg zu existieren.

7. Eine mit der BUdR-Dosis praktisch linear zunehmende Wachstumsreduktion der langen Extremitätenknochen erfolgt unabhängig vom Applikationstag; am stärksten werden Radius und speziell die Tibia betroffen.

8. Durch Zuordnung des distalen Ossifikationstempos zum Wachstum der proximalen Extremitätenknochen wird eine geordnete Entwicklung der fetalen Mäuseextremität aufgezeigt, die durch BUdR gleichsinnig gehemmt wird.

9. "Defektmißbildungen" wie Oligo- und Adaktylien sind mit stärker, "Überschußmißbildungen" wie Polydaktylien sind mit schwächer reduzierten Extremitäten kombiniert ($P < 0,0002$).

10. Die Befunde werden unter Verwendung der bisher bekannten biochemischen Folgen der durch BUdR-Einbau somatisch-mutierten DNS diskutiert.

SUMMARY:

Experiments to a quantitative characterization of the teratogenic effects of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BUdR) on fetal limbs of NMRI-mice.

1. After a short review of the biological effects of BUdR, especially on some differentiation processes, the teratogenic responses of embryonic mice to BUdR were discussed.
2. In these experiments gravide NMRI mice were treated on day 9 p.c. or on day 10 p.c. i.p. with 200 or 400 and 400 or 800 mgs BUdR/kg body weight. The control animals get aliquots of physiological saline. Altogether 657 fetuses were prepared per section on day 18 p.c. and the skeletal tissues of these fetuses were stained with alizarin red S after treatment with KOH.
3. By treatment with BUdR the following malformations were induced: polydactylism, adactylism, two different kinds of syndactylism, and supernumerary ribs. These malformations do not appear in untreated NMRI mice. The polydactylies were seen favoured on the hind limbs, but with no significant difference between the right and left sides.
4. Oligodactylies appear in about 1.5 % of the untreated control mice - these malformations increase after treatment with BUdR.
5. On day 9 p.c. BUdR induces specially oligo- and adactylism, on day 10 p.c. polydactylism, syndactylism and supernumerary ribs.
6. Clear-cut dose-response relationships were seen for the induction of supernumerary ribs by BUdR. The digital defects and aberrations are induced with threshold values of

about 400 mgs BUdR/kg body weight.

7. A definite dose-response relationship exists for the reduction of the length of the long bones of the limbs. The largest reductions by BUdR were seen on the tibia and (with a smaller intensity) on the radius.

8. The speed of the apical ossification and the length growth of the limb bones are well correlated and are depressed by BUdR in the same manner.

9. Oligo- and adactylism as kinds of "defect malformations" appears on stronger, polydactylism as a kind of "overshoot malformation" appears on weaker shortened limbs ($P < 0,0002$).

10. The results of the experiments were discussed with respect to the known biochemical effects of the BUdR-DNA.

6. Literatur

- Abbott, J., and H. Holtzer (1968): The loss of phenotypic traits by differentiated cells. V. The effects of 5-bromodeoxyuridine on cloned chondrocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 59, 1144 - 1151
- Abbott, J., Mayne, R., and H. Holtzer (1972): Inhibition of cartilage development in organ cultures of chick somites by the thymidine analog 5-bromodeoxyuridine.
Dev. Biol. 28, 430 - 442
- Anderson, H.C., Chacko, S., Abbott, J., and H. Holtzer (1970): The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. VII. Effects of 5-bromodeoxyuridine and prolonged culturing on fine structures of chondrocytes.
Amer. J. Path. 60, 289 - 310
- Baldwin, R.L., and E.M. Shooter (1963): The alkaline transition of B^U-containing DNA and its bearing on the replication of DNA.
J. Mol. Biol. 7, 511 - 526
- Belitz, H.-J. (1960): Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie.
Der Mathematikunterricht, S. 83 - 103
- Bischoff, R., and H. Holtzer (1968): Inhibition of hyaluronic acid synthesis by BUdR in cultures of chick amnion cells.
Anat. Rec. 160, 317
- Bischoff, R., Rich, M.A., and M.L. Ejdenoff (1970): Inhibition of myoblast fusion after one round of DNA synthesis by 5-bromodeoxyuridine.
J. Cell Biol. 44, 134 - 150

- Bischoff, R. (1971): Acid mucopolysaccharide synthesis by chick amnion cell cultures - inhibition by 5-bromodeoxyuridine.
Exper. Cell Res. 66, 224 - 236
- Chacko, S., Holtzer, S., and H. Holtzer (1969): Suppression of chondrogenic expression in mixtures of normal chondrocytes and BUdR-altered chondrocytes grown in vitro.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 183 - 189
- Chacko, S. (1972): Effect of BUdR on the emergence of cardiac muscle cells in the developing embryo.
J. Cell Biol. 55, 36 A
- Chacko, S., and X. Joseph (1974): The effect of 5-bromodeoxyuridine (BrdU) on cardiac muscle differentiation.
Dev. Biol. 40, 340 - 354
- Chaube, S., and M. L. Murphy (1968): The teratogenic effects of the recent drugs active in cancer chemotherapy.
Adv. Teratol. 3, 204 - 250
- Cheong, L., Rich, M.A., and M. L. Ejdenoff (1960): Introduction of 5-halogenated pyrimidines into deoxyribonucleic acid of mammalian cells in culture.
J. Biol. Chem. 235, 1441
- Cleaver, J.E. (1967): Repair replication and degradation of bromouracil-substituted DNA in mammalian cells after irradiation with ultraviolet light.
Biophys. J. 7, 775 - 791
- Coleman, J.R., Coleman, A.W., and E.J.H. Hartline (1969): A clonal study of the reversible inhibition of muscle differentiation by the halogenated thymidine analog 5-bromodeoxyuridine.
Dev. Biol. 19, 527 - 548

- Coleman, A.W., Coleman, J.R., Kankel, D., and I. Werner (1970): The reversible control of animal cell differentiation by the thymidine analog 5-bromodeoxyuridine.
Exper. Cell Res. 39, 319 - 328
- DiPaolo, J.A. (1964): Polydactylism in the offspring of mice injected with 5-bromodeoxyuridine.
Science, 145, 501 - 503
- Djordjevic, B., and W. Szybalski (1960): Genetics of human cell lines. III. Incorporation of 5-bromo and 3-iodo-deoxyuridine into the deoxyribonucleic acid of human cells and its effects on radiation sensitivity.
J. exper. Med. 112, 509 - 531
- Dutton, R.W., Dutton, A.H., and J. H. Vaughn (1960): The effect of 5-bromouracil deoxyribonucleoside on the synthesis of antibody in vitro.
Biochem. J. 75, 230
- Fabian, B., and F. Wilt (1973): The incorporation of 5-bromodeoxyuridine into DNA of the area opaca vasculosa of chick embryos.
Dev. Biol. 33, 92 -100
- Gerber, P. (1972): Activation of Epstein-Barr virus by 5-bromodeoxyuridine in "virus-free" human cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 83 - 85
- Goz, B. (1974): The induction of alkaline phosphatase activity in HeLa cells by 5-iodo-2'-deoxyuridine.
Cancer Res. 34, 2393 - 2398

- Hakala, M. (1959): Mode of action of 5-bromodeoxyuridine on mammalian cells in culture.
J. Biol. Chem. 234, 3072
- Holthausen, H.S., Chacko, S., Davidson, E.A., and H. Holtzer (1969): Effects of 5-bromodeoxyuridine on expression of cultured chondrocytes grown in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 63, 864 - 870
- Jensh, R.P., and R. L. Brent (1966): Rapid schedules for KOH clearing and Alizarin Red S staining of fetal rat bones.
Stain Technol. 41, 179 - 183
- Jones, T.C., and W.F. Dove (1972): Photosensitization of transscription by bromodeoxyuridine substitution.
J. Mol. Biol. 64, 409 - 416
- Kit, S., Dubbs, D.R., and P.M. Frearson (1966): HeLa cells resistant to bromodeoxyuridine and deficient in thymidine kinase activity.
J. Cancer 1, 19 - 30
- Kotzin, B.L., and B.F. Baker (1972): Selective inhibition of genetic transcription in sea urchin embryos. Incorporation of 5-bromodeoxyuridine into low molecular weight nuclear DNA.
J. Cell Biol. 55, 74 - 81
- Koyama, H., and T. Ono (1971): Induction of alkaline phosphatase by 5-bromodeoxyuridine in a hybrid line between mouse and Chinese hamster in culture.
Exper. Cell Res. 69, 468 - 470

- Koyama, H., and T. Ono (1971): Effect of 5-bromodeoxyuridine on hyaluronic acid synthesis of a clonal line of mouse and Chinese hamster in culture.
J. cell. Physiol. 78, 263 - 272
- Koyama, H., and T. Ono (1972): Further studies on the induction of alkaline phosphatase by 5-bromodeoxyuridine in hybrid line between mouse and Chinese hamster in culture.
Biochim. Biophys. Acta 264, 497 - 507
- Kriss, J.P., and L. Revesz (1962): The distribution and fate of bromodeoxyuridine and bromodeoxycytidine in the mouse and the rat.
Cancer Res. 22, 254 - 265
- Lasher, R., and R. D. Cahn (1969): The effects of 5-bromodeoxyuridine on the differentiation of chondrocytes in vitro.
Dev. Biol. 19, 415 - 435
- Levitt, D., and M. Dorfman (1972): The irreversible inhibition of differentiation of limb-bud mesenchyme by bromodeoxyuridine.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 1253 - 1257
- Lin, S.-Y., and A.D. Riggs (1972): Lac operator analogues: Bromodeoxyuridine substitution in the lac operator affects the rate of dissociation of the lac repressor.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 2574 - 2576
- Littlefield, J.W., and E.A. Gould (1960): The toxic effect of 5-bromodeoxyuridine in cultured epithelial cells.
J. Biol. Chem. 235, 1129

- Iowa, R.D., Rowe, W.P., Teich, N., and J. W. Hartley
(1971): Murine leukemia virus: High-frequency activation in vitro by 5-bromodeoxyuridine and 5-iododeoxyuridine.
Science 174, 155 - 156
- Lykkesfeldt, A.E., and H. A. Anderson (1975): Inhibition of rRNA synthesis following incorporation of 5-bromodeoxyuridine into DNA of Tetrahymena pyriformis.
J. Cell Sci. 17, 495 - 502
- Marzullo, G. (1972): Regulation of cartilage enzymes in cultured chondrocytes and the effect of 5-bromodeoxyuridine.
Dev. Biol. 27, 20 - 26
- Mayne, R., Sanger, J.W., and H. Holtzer (1971): Inhibition of mucopolysaccharide synthesis by 5-bromodeoxyuridine in cultures of chick amnion cells.
Dev. Biol. 25, 547 - 567
- Miura, Y., and F. H. Wilt (1971): The effects of 5-bromodeoxyuridine in yolk sac erythropoiesis in the chick embryo.
J. Cell Biol. 48, 523 - 532
- Neubert, D., Tapken, S., and H.-J. Merker (1974): Induction of skeletal malformations in organ cultures of mammalian embryonic tissues.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 286, 271 - 282
- O'Neill, M., and F. E. Stockdale (1974): 5-Bromodeoxyuridine inhibition of differentiation. Kinetics of onhibition and reversal in myoblasts.
Dev. Biol. 37, 117 - 132

Packard jr., D.S., Menzies, R.A., and R.G. Skalko (1973):

Incorporation of thymidine and its analogue bromodeoxyuridine into embryos and maternal tissues of the mouse.

Differentiation 1, 397 - 406

Packard jr., D.S., Skalko, R.G., and R.A. Menzies (1974):

Growth retardation and cell death in mouse embryos following exposure to the teratogen bromodeoxyuridine.

Exper, Molec. Path. 21, 351 - 362

Palmoski, M.J., and P.F. Goetinck (1972): Synthesis of proteochondroitin sulphate by normal, nanomelic, and 5-bromodeoxyuridine-treated chondrocytes in cell culture.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 3385 - 3388

Puck, T., and F. Kao (1967): Genetics of somatic mammalian cells. V. Treatment with 5-bromodeoxyuridine and visible light for isolation of nutritionally deficient mutants.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58, 227 - 254

Rizki, R.M., and T.M. Rizki (1969): Somatic cell lesions induced by the base analog 5-bromodeoxyuridine.

Cancer Res. 29, 201 - 208

Rizki, R.M., Douthit, H.A., and T.M. Rizki (1972): Morphogenetic effects of halogenated thymidine analogs on Drosophila. II. Incorporation of 5-bromodeoxyuridine into DNA.

Mutation Res. 14, 107 - 111

- Roetz, R., und G. Michels (1976): Quantitative Aspekte der teratogenen Wirkung von 5-Brom-2'-desoxyuridin (BUdR) an der fetalen Mäuseextremität.
71. Versammlung d. Anatom. Ges., Rostock-Warnemünde, 5.-9.4.1976 - Anatom. Anz. (im Druck)
- Rownd, R. (1967): The buoyant density of 5-bromouracil labeled DNA.
- Biochim. Biophys. Acta 134, 464 - 467
- Ruffolo, P.R., and V.H. Ferm (1965): The embryocidal and teratogenic effects of 5-bromodeoxyuridine in the pregnant hamster.
- Lab. Invest. 14, 1542 - 1553
- Sano, K., Hoshino, T., and M. Nagai (1968): Radio sensitization of brain tumor cells with a thymidine analog (bromouridine).
- J. Neurosurg. 28, 530 - 538
- Scaife, J.P. (1970): RNA synthesis and uridine pools in normal and BUdR-containing kidney T-cells after U.V.-irradiation.
- Internat. J. Radiat. Biol. 18, 189 - 192
- Schubert, D., and F. Jacob (1970): 5-Bromodeoxyuridine-induced differentiation of a neuroblastoma.
- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67, 247 - 254
- Schwartz, J.P., Morris, N.R., and B.M. Breckenridge (1973): Adenosine-3'.5'-monophosphate in glial tumor cells. Alterations by 5-bromodeoxyuridine.
- J. Biol. Chem. 248, 2699 - 2704
- Schwartz, S.A., and W.H. Kirsten (1974): Tissue-specific suppression of differentiation by 5-bromodeoxyuridine in vitro.
- J. Dental Res. 53, 509 - 515

- Schwartz, S.A., Horio, D., and W.H. Kirsten (1974): Non-random incorporation of 5-bromo-deoxyuridine in rat cell DNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 927 - 933
- Skalko, R.G., and D.S. Packard jr. (1973): Teratogenic response of the mouse embryo to 5-iododeoxyuridine. *Experientia* 29, 198 - 200
- Skalko, R.G., Packard jr., D.S., Schwendiman, R.N., and J. F. Raggio (1971): The teratogenic response of mouse embryos to 5-bromodeoxyuridine.
Teratology 29, 198 - 200
- Stellwagon, R.H., and G.M. Tomkins (1971): Preferential inhibition by 5-bromodeoxyuridine of the synthesis of tyrosine aminotransferase in hepatoma cell cultures. *J. Mol. Biol.* 56, 167 - 182
- Stellwagon, R.H., and G. Tomkins (1971): Differential effect of 5-bromodeoxyuridine on the concentrations of specific enzymes in hepatoma cells in culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 1147 - 1150
- Stockdale, F.E., Okazaki, D., Nameroff, M., and H. Holtzer (1964): 5-Bromodeoxyuridine: Effect on myogenesis in vitro.
Science 146, 533 - 535
- Stockdale, F.E., and M.C. O'Neill (1973): A kinetic analysis and model of 5-bromodeoxyuridine inhibition of differentiation of skeletal muscle cells.
Excerpta Medica Found. Congr. Ser. no. 333: Exploring concepts in muscular dystrophy II, pp. 105 - 117

- Szybalski, W., and B. Djordjevic (1960): Radiosensitization of human cells by partial 5-bromodeoxyuridine substitution of the DNA component.
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 3, 155
- Turrington, R.W., Majumder, G.C., and M. Riddle (1971): Inhibition of mammary gland differentiation in-vitro by 5-bromodeoxyuridine.
J. Biol. Chem. 246, 1814 - 1819
- Wasyliw, O.W. (1973): Effects of 5-bromodeoxyuridine (BUdR) on mouse limb development.
Ph.D. Thesis, Univ. of Iowa, Iowa City, USA
- Weber, E. (1967): Grundriß der biologischen Statistik.
VEB Fischer, Jena
- Webster, W., Shimada, M., and J. Langman (1973): Effects of fluorodeoxyuridine, colcemid, and bromodeoxyuridine on developing neocortex of the mouse.
Amer. J. Anat. 137, 67 - 86
- Wilt, F.M., and M.R. Anderson (1972): The action of 5-bromodeoxyuridine on differentiation.
Dev. Biol. 28, 443 - 447
- Wrathal, J.R., Oliver, C.S., Silagi, S., and E. Essner (1973): Suppression of pigmentation in mouse melanoma cells by 5-bromodeoxyuridine.
J. Cell. Biol. 57, 406 - 423

A N H A N G

Ergebnisse der statistischen Analysen

Ergebnisse der statistischen Analysen.

Erläuterungen:

K = Kontrollgruppe;

A1 = 200 mg BUDR/kg, d 9 p.c.;

A2 = 400 mg BUDR/kg, d 9 p.c.;

B1 = 400 mg BUDR/kg, d 10 p.c.;

B2 = 800 mg BUDR/kg, d 10 p.c.

Signifikanzen: n.b. = nicht berechnet;

h.s. = hoch signifikant ($P < 0,0027$)

s. = signifikant ($0,01 > P > 0,0027$)

s.? = fraglich signifikant ($0,05 > P > 0,01$)

n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$)

K/A1 usw. bedeutet statistischer Vergleich zwischen Werten der Versuchsgruppen K und A1.

Humeruslängen (alle Tiere, t-Test):

K/A1 ($t = 13,3$), $P < 0,0002$ - h.s.

A1/A2 ($t = 12,3$), $P < 0,0002$ - h.s.

A2/B1 n.b. - n.s.

K/B1 n.b., - h.s.

B1/B2 ($t = 1,82$), P ca. 0,07 - n.s.

Radiuslängen (alle Feten, t-Test):

K/A1 ($t = 14,11$), $p < 0,0002$ - h.s.

A1/A2 ($t = 6,61$), $P < 0,0002$ - h.s.

A2/B1 ($t = 3,07$), P ca. 0,0027 - s.

K/B1 n.b., h.s.

B1/B2 ($t = 5,83$), $P < 0,0002$ - h.s.

Ulnalängen (alle Feten, t-Test):

K/A1 ($t = 9,43$), $p < 0,0002$ - h.s.

A1/A2 ($t = 7,87$), $P < 0,0002$ - h.s.

A2/B1 n.b., n.s.

K/B1 n.b., h.s.

B1/B2 ($t = 7,31$), $P < 0,0002$ - h.s.

Ergebnisse der statistischen Analysen.

(1. Fortsetzung)

Femurlängen (alle Feten, t-Test):

K/A1 ($t = 7,51$), $P < 0,0002$ - h.s.

A1/A2 ($t = 9,88$), $P < 0,0002$ - h.s.

A2/B1 n.b., n.s.

K/B1 n.b., h.s.

B1/B2 ($t = 5,83$), $P < 0,0002$ - h.s.

Tibialängen (alle Feten, t-Test):

K/A1 ($t = 8,26$), $P < 0,0002$ - h.s.

A1/A2 ($t = 10,8$), $P < 0,0002$ - h.s.

A2/B1 n.b., n.s.

K/B1 n.b., h.s.

B1/B2 ($t = 3,80$), $P < 0,0002$ - h.s.

Fibulalängen (alle Tiere, t-Test):

K/A1 ($t = 9,44$), $P < 0,0002$ - h.s.

A1/A2 ($t = 4,31$), $P < 0,0002$ - h.s.

A2/B1 ($t = 3,70$), $P \text{ ca. } 0,0002$ - h.s.

K/B1 n.b., h.s.

B1/B2 ($t = 11,9$), $P < 0,0002$ - h.s.

Humeruslängen, abhängig vom Ossifikationsmuster der Phalangen (t-Test): Feten der Gruppe K

I/I//II/II ($t = 1,53$), $P > 0,1$ - n.s.

II/II//III/III ($t = 2,17$), $P \text{ ca. } 0,03$ - s.

III/III//IV/IV ($t = 1,94$), $P \text{ ca. } 0,05$ - s.

I/I//III/III ($t = 6,15$), $P < 0,0002$ - h.s.

Radiuslängen, abhängig vom Ossifikationsmuster der Phalangen (t-Test): Feten der Gruppe K

I/I//II/II ($t = 0,70$), $P > 0,3$ - n.s.

II/II//III/III ($t = 3,76$), $P \text{ ca. } 0,0002$ - h.s.

III/III//IV/IV ($t = 3,10$), $P \text{ ca. } 0,0027$ - s.

I/I//III/III ($t = 7,27$), $P < 0,0002$ - h.s.

Ulnalängen, abhängig vom Ossifikationsmuster der Phalangen (t-Test): Feten der Gruppe K

I/I//II/II ($t = 1,78$), $P \text{ ca. } 0,1$ - n.s.

II/II//III/III ($t = 2,57$), $P \text{ ca. } 0,01$ - s.

III/III//IV/IV ($t = 2,14$), $P \text{ ca. } 0,04$ - s.

I/I//III/III ($t = 7,22$), $P < 0,0002$ - h.s.

Ergebnisse der statistischen Analysen.

(2. Fortsetzung)

Femurlängen, abhängig von der Zahl der Ossifikationspunkte (OP) der Phalangen (t-Test): Feten der Gruppe K

<10 OP/10 OP ($t = 8,68$), $P < 0,0002$ - h.s.

10 OP/>10 OP ($t = 9,17$), $P < 0,0002$ - h.s.

<10 OP/>10 OP n.b., h.s.

Tibiallängen, abhängig von der Zahl der Ossifikationspunkte (OP) der Phalangen (t-Test): Feten der Gruppe K

<10 OP/10 OP ($t = 8,97$), $P < 0,0002$ - h.s.

10 OP/>10 OP ($t = 4,48$), $P < 0,0002$ - h.s.

<10 OP/>10 Op n.b., h.s.

Fibulalängen, abhängig von der Zahl der Ossifikationspunkte (OP) der Phalangen (t-Test): Feten der Gruppe K

<10 OP/10 OP ($t = 8,17$), $P < 0,0002$ - h.s.

10 OP/>10 OP ($t = 12$), $P < 0,0002$ - h.s.

<10 OP/>10 OP ($t = 6,09$), $P < 0,0002$ - h.s.

Häufigkeit eines 14. Rippenpaares (Chi²-Test):

K/A1 (Chi² = 24,22), $P \text{ ca. } 0,000001$ - h.s.

A1/A2 n.b., h.s.

A2/B1 (Chi² = 3,29), $P > 0,07$ - n.s.

B1/B2 n.b., n.s.

K/B1 n.b., h.s.

Polydaktylien der Vorderextremitäten (Chi²-Test):

K/A1 (Chi² = 1,04), $P \text{ ca. } 0,3$ - n.s.

A1/A2 (Chi² = 1,40), $P \text{ ca. } 0,24$ - n.s.

B1/B2 (Chi² = 1,85), $P > 0,1$ - n.s.

A2/B1 (Chi² = 1,83), $P > 0,1$ - n.s.

K/A2 (Chi² = 2,91), $P \text{ ca. } 0,058$ - n.s.

Oligodaktylien der Vorderextremitäten (Chi²-Test):

K/A2 (Chi² = 3,47), $P \text{ ca. } 0,052$ - n.s.

K/B2 (Chi² = 14,87), $P \text{ ca. } 0,0001$ - h.s.

Syndaktylien der Vorderextremitäten (Chi²-Test):

K/B2 (Chi² = 14,35), $P \text{ ca. } 0,00015$ - h.s.

Ergebnisse der statistischen Analysen.

(3. Fortsetzung)

Polydaktylien der hinteren Extremitäten (χ^2 -Test):

K/A2 ($\chi^2 = 7,07$), $P > 0,01$ - s.

K/A1 n.b., n.s.

B1/B2 n.b., n.s.

K/B1 n.b., h.s.

K/B2 n.b., h.s.

Syndaktylien der hinteren Extremitäten (χ^2 -Test):

K/B2 ($\chi^2 = 11,88$), $P < 0,001$ - h.s.

B1/B2 ($\chi^2 = 4,05$), P ca. 0,05 - n.s.

Oligodaktylien der hinteren Extremitäten (χ^2 -Test):

K/A1 n.b., n.s.

K/A2 ($\chi^2 = 2,00$), P ca. 0,16 - n.s.

K/B1 n.b., n.s.

Adaktylien der hinteren Extremitäten (χ^2 -Test):

K/A1 ($\chi^2 = 1,56$), $P > 0,2$ - n.s.

K/A2 ($\chi^2 = 11,31$), $P < 0,001$ - h.s.

K/B2 ($\chi^2 = 7,11$), P ca. 0,008 - s.

A1/A2 ($\chi^2 = 12,65$), P ca. 0,0004 - h.s.

Ossifikationsdefekte (A- + Oligodaktylien) der hinteren Extremitäten (χ^2 -Test):

K/A2 ($\chi^2 = 12,52$), P ca. 0,0004 - h.s.

K/B2 ($\chi^2 = 3,92$), P ca. 0,05 - s.?

Häufigkeit der Summe aller Ossifikationsdefekte und -störungen der Phalangen der hinteren Extremitäten (χ^2 -Test):

K/A2 ($\chi^2 = 21,30$), $P < 0,000001$ - h.s.

K/A1 ($\chi^2 = 0,52$), $P > 0,3$ - n.s.

B1/B2 n.b., n.s.

Ergebnisse der statistischen Analysen.

(4. Fortsetzung)

Ossifikationsmuster der Phalangen der Vorderextremitäten
(χ^2 -Test): Musterhäufigkeit I/I

K/A1	($\chi^2 = 0,35$), $P > 0,3$ - n.s.
K/A2	($\chi^2 = 3,40$), $P \text{ ca. } 0,065$ - n.s.
K/B1	($\chi^2 = 1,13$), $P \text{ ca. } 0,3$ - n.s.
K/B2	($\chi^2 = 6,16$), $P \text{ ca. } 0,017$ - s.?
A1/A2	($\chi^2 = 2,40$), $P \text{ ca. } 0,12$ - n.s.
B1/A2	($\chi^2 = 6,61$), $P \text{ ca. } 0,01$ - s.
B1/B2	($\chi^2 = 9,66$), $P \text{ ca. } 0,001$ - h.s.

Anzahl der Ossifikationspunkte der Phalangen der hinteren Extremitäten (χ^2 -Test): Gruppe mit mehr als 10 Ossifikationspunkten.

K/A1	($\chi^2 = 21,58$), $P < 0,00001$ - h.s.
K/A2	($\chi^2 = 12,99$), $P \text{ ca. } 0,0003$ - h.s.
K/B1	($\chi^2 = 5,37$), $P \text{ ca. } 0,02$ - s.?
K/B2	($\chi^2 = 18,73$), $P < 0,0001$ - h.s.
A2/B1	($\chi^2 = 23,65$), $P < 0,00001$ - h.s.

Vergleich der Längen der langen Röhrenknochen der Hinterextremitäten bei Ossifikationsdefekten mit den Mittelwerten der jeweiligen Versuchsgruppen (t-Test):

Femur:

A2	($t = 4,15$), $P < 0,0002$ - h.s.
B1	($t = 11,11$), $P < 0,0002$ - h.s.

Tibia:

A2	($t = 4,62$), $P < 0,0002$ - h.s.
B1	($t = 11,94$), $P < 0,0002$ - h.s.

Fibula:

A2	($t = 4,37$), $P < 0,0002$ - h.s.
B1	($t = 12,68$), $P < 0,0002$ - h.s.

Lebenslauf

Am 24. August 1947 wurde ich, Brigitte Annemarie, genannt Gitti, Michels, als deutsche Staatsangehörige in Worms/Rhein geboren. Nach dem Besuch der Grundschule Albisheim (1954 - 1958), des Nordpfalz-gymnasiums (1958 - 1962) und der Heimschule Weierhof (1962 - 1968) bestand ich die Reifeprüfung am 22. Juni 1968 an der Heimschule Weierhof. Zum Wintersemester 1968/69 wurde ich zum Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin immatrikuliert, das ich in Berlin bis zur Approbation durchführte. Die tierärztliche Vorprüfung habe ich am 10. 4. 1972, die tierärztliche Prüfung am 19. 8. 1975 mit Erfolg bestanden. Am 22. 8. 1975 erhielt ich die Approbation als Tierärztin. Zwischen Februar und August 1975 habe ich am Institut für Anatomie die Arbeiten zur Promotion durchgeführt. Seit dem 1. September 1975 bin ich als Assistentin in der Großtierpraxis von Dr. med. vet. G. Wilhelm in Kaiserslautern tätig.

Gitti Michels

